



Contrôle des dommages oxydants au noyau spermatique : apports des modèles murins knock-out pour des glutathion peroxydases

Anaïs Noblanc

► To cite this version:

Anaïs Noblanc. Contrôle des dommages oxydants au noyau spermatique : apports des modèles murins knock-out pour des glutathion peroxydases. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2013. Français. NNT : 2013CLF22365 . tel-00910258

HAL Id: tel-00910258

<https://theses.hal.science/tel-00910258>

Submitted on 27 Nov 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**
N° d'ordre 612

THÈSE

Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

SPÉCIALITÉ : PHYSIOLOGIE ET GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRES

Soutenue le 5 juillet 2013

ANAÏS NOBLANC

**Contrôle des dommages oxydants
au noyau spermatique**

**Apports des modèles murins *knock-out*
pour des glutathion peroxydases**

Président :	Pr. Laurent Morel (Clermont-Ferrand)
Rapporteurs :	Dr. Valérie Grandjean (Nice)
	Dr. Aminata Touré (Paris)
Examineurs :	Dr. Pierre Ray (Grenoble)
	Pr. Patrick Vernet (Clermont-Ferrand)
	Dr. Ayhan Kocer (Co-encadrant)
	Pr. Joël Drevet (Directeur de thèse)

Laboratoire GReD : Génétique, Reproduction & Développement
UMR CNRS 6293 - Clermont Université - INSERM U1103
Équipe « Mécanismes de l'infertilité post-testiculaire »
Campus des Cézeaux
24 Avenue des Landais
63 171 Aubière

*À vous, futurs stagiaires et doctorants,
qui allez devoir lire cette thèse avant de
pouvoir vous amuser à la paillasse !*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Docteur Grandjean et le Docteur Touré pour avoir accepté de consacrer une partie de leur temps à la correction et à l'évaluation de ce travail. Je remercie également le Professeur Morel, le Docteur Ray et le Professeur Vernet pour leur participation à mon jury.

Je remercie grandement le Professeur Drevet pour m'avoir permis de prendre part à son équipe de recherche « Mécanismes de l'infertilité post-testiculaire » pour effectuer ce doctorat dans les meilleures conditions. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir donné ma chance, alors qu'il ne me connaissait pas, et de m'avoir guidée et conseillée durant ce passionnant travail de recherche.

Je remercie chaleureusement le Docteur Kocer pour son encadrement tout au long de ce doctorat. Sur le plan scientifique, son enseignement, ses conseils et le partage de son expérience m'ont été d'une grande aide dans la réalisation de mon travail. Sur le plan humain, sa bonne humeur contagieuse, sa franchise et son écoute attentive m'ont permis de garder le moral, malgré la distance me séparant de ma famille et de mes amis.

Je remercie Claire Szczepaniak, Christelle Blavignac et Christophe Montaurier pour leur participation à ces recherches et pour m'avoir fait profiter de leur expertise scientifique. Un grand merci à Christelle Damon-Soubeyrand pour m'avoir « mis le pied à l'étrier » à mon arrivée dans l'équipe, pour sa grande aide et le partage de ses nombreuses connaissances dans le domaine de la coloration et de l'immunomarquage des cellules et des tissus. Merci également pour nos conversations amicales.

Je tiens à remercier également les autres membres de l'équipe, Joëlle Henry-Berger, Rachel Guiton, Fabrice Saez, Rémi Cadet, Françoise Grath, Aïcha Jrad-Lamine et Aurélia Ouvrier, pour leur accueil, leur soutien, leurs conseils scientifiques ou non et la bonne ambiance générale qu'ils entretiennent quotidiennement au laboratoire.

Merci également à Manon Peltier et Julie Durif, qui ont participé à ces travaux en tant que stagiaires et m'ont aidée à produire ces résultats.

Enfin, un grand merci à ma famille, qui m'a soutenue dans mon parcours. Ma mère, pour m'avoir laissée trouver ma voie, sans essayer de m'influencer, en m'aidant à me poser les bonnes questions et en me faisant part de ses conseils et de son expérience de la vie. Mon frère, mon total opposé si complémentaire, qui m'encourage à plus profiter de la vie et à m'ouvrir au monde.

SOMMAIRE

Abréviations	1
Résumé	5
Introduction	7
État de l'art.....	10
I. L'organisation de la chromatine spermatique	11
1. La chromatine des cellules somatiques	11
a. L'organisation de la chromatine.....	11
b. Le remodelage de la chromatine.....	14
2. Les réarrangements chromatinien des cellules germinales	21
a. La formation des cellules germinales primordiales	21
b. La mise en place de l'empreinte parentale dans les cellules germinales primordiales.....	22
c. L'évolution de la chromatine lors de la spermatogenèse	23
d. L'architecture nucléaire spermatique.....	32
3. La maturation spermatique épидидymaire	36
a. L'épididyme	36
b. La condensation de la chromatine spermatique épидидymaire	39
II. Les effets des espèces oxygénées réactives sur la chromatine spermatique.....	40
1. La production des EOR.....	40
2. Les effets des EOR lors de la maturation des spermatozoïdes	41
a. Des acteurs indispensables de la maturation spermatique	42
b. Des molécules particulièrement nocives pour les spermatozoïdes.....	47
c. L'impact des dommages oxydants spermatiques sur la fertilité.....	49
3. Les systèmes de régulation des EOR protégeant les spermatozoïdes	51
a. Les mécanismes non enzymatiques de recyclage des EOR.....	51
b. Les mécanismes enzymatiques de recyclage des EOR	57
III. Les travaux de thèse	67
Matériels & Méthodes.....	68
I. Les animaux.....	69
1. Hébergement	69
2. Modèles murins	69
3. Génotypage	69
a. Extraction de l'ADN génomique.....	69
b. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	70
4. Manipulations	70
a. Test de fertilité.....	70
b. Prélèvements	70

II.	Analyses tissulaires	71
1.	Préparation des coupes de tissu	71
2.	Coloration.....	71
III.	Analyses spermatiques.....	72
1.	Coloration de Shorr	72
2.	Coloration au bleu de toluidine.....	72
3.	Cytométrie en flux.....	73
4.	Microscopie électronique.....	73
5.	Analyses de la fragmentation de l'ADN	74
6.	Immunocytochimie et immunocytofluorescence	75
7.	Analyse de l'acrosome et du noyau.....	76
IV.	Dosage du malondialdéhyde	77
V.	Analyses transcriptionnelles	77
1.	Extraction de l'ARN.....	77
2.	Reverse transcription	77
3.	Préparation d'une gamme d'étalonnage	78
4.	PCR quantitative.....	78
VI.	Analyses protéiques	78
1.	Extraction des protéines	78
2.	Mesure de l'activité glutathion peroxydase.....	78
VII.	Analyses de la chromatine spermatique.....	79
1.	Fractionnement de la chromatine spermatique	79
2.	Immunoprécipitation de l'ADN spermatique.....	80
a.	Extraction, purification et fragmentation de l'ADN spermatique.....	80
b.	Immunoprécipitation de l'ADN.....	81
3.	Dot blot	81
a.	ADN	81
b.	Chromatine.....	82
VIII.	Analyses statistiques	82
Résultats.....	83	
I.	La caractérisation phénotypique des souris <i>sngpx4;gpx5</i>^{-/-}	84
1.	La validation du modèle murin <i>sngpx4;gpx5</i> ^{-/-}	84
2.	L'analyse histologique de l'épididyme	84
3.	L'analyse des paramètres spermatiques.....	85
a.	La numération des gamètes.....	85
b.	La morphologie des spermatozoïdes	85
4.	L'effet de la double invalidation sur la maturation de la chromatine spermatique...88	
a.	La structure de la chromatine	88
b.	L'expression épидидymaire des gènes des protéines disulfide isomérases.....	90
c.	La sensibilité des spermatozoïdes aux conditions réductrices	90
5.	Les effets de la double invalidation sur le statut redox au sein de l'épididyme.....	91

a.	<i>La peroxydation lipidique</i>	91
b.	<i>Les dommages oxydants de l'ADN spermatique.....</i>	91
c.	<i>Les protéines antioxydantes</i>	92
6.	La fonction de reproduction des mâles <i>snGpx4;gpx5^{-/-}</i>	94
II.	L'étude de la localisation des dommages oxydants au sein de l'ADN spermatique de souris	95
1.	L'organisation de la chromatine spermatique épидидymaire de souris et la localisation des dommages oxydants.....	95
a.	<i>La distribution spatiale des différentes protéines nucléaires basiques spermatiques murines</i>	<i>95</i>
b.	<i>La localisation spatiale des dommages oxydants dans les spermatozoïdes murins</i>	<i>96</i>
2.	La localisation chromosomique des dommages oxydants	98
III.	L'étude de l'efficacité d'une supplémentation orale antioxydante sur l'infertilité des souris <i>gpx5^{-/-}</i>	100
	Discussion & Perspectives	101
I.	Les rôles de snGPx4 et GPx5 lors de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes.....	102
II.	La localisation des dommages oxydants sur l'ADN spermatique.....	110
III.	Les effets d'une supplémentation orale antioxydante sur la fonction de reproduction des souris mâles	113
IV.	Conclusion	114
	Références	115
	Publications	134

ABRÉVIATIONS

4-HNE	4-hydroxynonénal
5'/3'-UTR	5'/3'- <i>untranslated region</i>
5-hmC	5-hydroxyméthylcytosine
5-mC	5-méthylcytosine
8-OHdG	7,8-dihydro-8-oxo-2'-déoxyguanosine
AC	adénylate cyclase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
ALH	amplitude de déplacement de la tête
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARNm	acide ribonucléique messager
ARNr	acide ribonucléique ribosomique
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ATP	adénosine triphosphate
BCF	fréquence de battement du flagelle
BER	<i>base excision repair</i> ou réparation par excision de base
BET	bromure d'éthidium
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
Brdt	<i>bromodomain testis-specific protein</i>
CASA	<i>computer assisted sperm analysis</i>
CENP-A	<i>centromer-specific protein A</i>
CMA3	chromomycine A3
CTAB	bromure de cétyltriméthylammonium
Da	Dalton
DKO	<i>double knock-out</i> ou double invalidation
Dlk1/Gtl2	<i>delta-like 1 homolog (Drosophila)/gene trap locus 2</i>
DMR	<i>differentially-methylated region</i> ou région différenciellement méthylée
DNase	désoxyribonucléase
Dnmt	ADN méthyl transférase
dNTP	mélange des 4 désoxyribonucléotides
dpc	<i>day post-coitum</i>
dpp	<i>day post-partum</i>
DSB	<i>double strand break</i> ou cassure double brin
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène glycol tétraacétique
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EOR	espèce oxygénée réactive
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FapyG	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamido-pyrimidine
FISH	<i>fluorescent in situ hybridization</i>
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
FIV	fécondation <i>in vitro</i>
GCL	glutamate cystéine ligase
GPx	glutathion peroxydase
Grx	glutarédoxine
GSH	glutathion réduit
GSSG	dimère de glutathion oxydé
GST	glutathion transférase
H1/H2A/H2B/H3/H4	histones canoniques
H1fnt/H1t2	<i>H1 histone family, member N, testis-specific</i>
H1t	<i>testis-specific histone 1</i>
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HAT	histone acétyltransférase
HCO ₃ ⁻	ion bicarbonate

HDAC	histone désacétylase
Hils	<i>histone H1-like protein in spermatids 1</i>
HMT	histone méthyltransférase
HOB _r	acide hypobromeux
HOCl	acide hypochloreux
HOX	<i>homeobox</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICSI	injection intracytoplasmique de spermatozoïde
Igf2	<i>insulin-like growth factor 2</i>
IgG	immunoglobuline de type G
INO80/SWR1	<i>inositol biosynthesis/SWI/SNF-related protein</i>
ISWI	<i>imitation switch</i>
JmjC	domaine Jumonji
JNK	<i>c-Jun NH₂-terminal protein kinase</i>
KDM	lysine déméthylase
LIN	linéarité de la trajectoire
LSD1/2	<i>lysine-specific demethylase 1/2</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAR	<i>matrix attachment region</i> ou région d'attachement à la matrice
mBrB	monobromobrimane
MDA	malondialdéhyde
MEB	microscopie électronique à balayage
meDIP	immunoprécipitation de l'ADN méthylé
MET	microscopie électronique à transmission
MNase	<i>micrococcal nuclease</i> ou nucléase micrococcalle
NA-ADN	<i>nuclear annulus-DNA sequence</i>
NAD ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NF κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NGS	<i>normal goat serum</i> ou sérum de chèvre
NI	5-nitro-guanidino hydantoïne
NO [•]	monoxyde d'azote
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>
O ₂	dioxygène
O ₂ ^{•-}	anion superoxyde
OH [•]	radical hydroxyle
ONOO ⁻	peroxynitrite
Oz	oxazolone
p300/CBP	<i>E1A-binding protein, 300kD/CREB binding protein</i>
pb	paire de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerization chain reaction</i> ou réaction de polymérisation en chaîne
PDI	protéine disulfide isomérase
Pdia	protéine disulfide isomérase de la famille A
PGC	<i>primordial germ cells</i> ou cellules germinales primordiales
PKA/PKC	protéine kinase A/C
PMA	procréation médicalement assistée
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
PNA	<i>peanut agglutinin</i>
Prm1/2	protamine1/2
Prx	peroxyrédoxine
PTK	protéine tyrosine kinase
Q-PCR	polymérisation en chaîne quantitative

Rasgfr1	<i>RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1 protein</i>
RDM	arginine déméthylase
RE	réticulum endoplasmique
RMT	arginine méthyltransférase
RNase	ribonucléase
S/MAR	<i>scaffold/matrix attachment regions</i> ou région d'attachement à la matrice
SCD	<i>sperm chromatin dispersion test</i>
SCSA	<i>sperm chromatin structure assay</i>
SDS	sodium dodécyl sulfate
SECIS	<i>Secys insertion sequence</i>
Secys	sélénocystéine
SEM	<i>standard error of mean</i> ou erreur standard de la moyenne
snGPx4	<i>sperm nuclear glutathione peroxidase 4</i>
SOD	superoxyde dismutase
SSB	<i>single strand break</i> ou cassure simple brin
STR	rectitude de la trajectoire
Suv39h	<i>suppressor of variegation 3-9 homolog (Drosophila)</i>
SWI/SNF	<i>switching and sucrose non-fermenting</i>
TBE	tampon « Tris, borate, EDTA »
TBS	<i>Tris buffer saline</i>
TH2A/B	<i>testis-specific histone 2A/B</i>
Tnp1/2	protéines de transition 1/2
TOPO I/II	topoisomérases I/II
Trx	thiorédoxine
TrxR	thiorédoxine réductase
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
Txndc	<i>thioredoxin domain containing protein</i>
VAP	vitesse sur la trajectoire moyenne
VCL	vitesse curvilinéaire
VSL	vitesse de progression linéaire
WT	<i>wild type</i> ou sauvage
Zdbf2	<i>zinc finger, DBF-type containing protein 2</i>

RÉSUMÉ

Les spermatozoïdes acquièrent leur pouvoir fécondant et leur mobilité lors de leur transit le long de l'épididyme. Paradoxalement, cette maturation épидидymaire nécessite la présence d'espèces oxygénées réactives (EOR) pour condenser la chromatine spermatique afin de mieux protéger l'ADN de ces mêmes molécules. Nous avons étudié la façon dont l'épididyme parvient à assurer l'équilibre entre un déficit et un excès d'EOR en caractérisant le phénotype épидидymaire de souris dont la production de deux enzymes antioxydantes glutathion peroxydases a été invalidée, GPx5 et snGPx4. L'épididyme de ces souris génère une réponse antioxydante élevée et augmente l'activité de pontage disulfure sur les gamètes en modulant l'expression génique d'enzymes antioxydantes (Trx, Prx, GST, SOD3, catalase) et de protéines disulfide isomérases (Pdia). Bien que ce sursaut d'activité soit efficace pour protéger les membranes du tissu et des spermatozoïdes, la chromatine des spermatozoïdes présente un défaut de condensation, laissant l'ADN spermatique vulnérable face aux EOR. Les gamètes présentent alors des dommages oxydants dans le noyau qui s'aggravent avec la diminution de l'activité antioxydante lors du vieillissement. Des approches immunologiques et biochimiques ont montré que les dommages oxydants se produisent préférentiellement sur l'ADN spermatique situé à la périphérie du noyau, qui est enrichi en nucléosomes persistants et qui est associé à la matrice nucléaire. Afin de déterminer s'il est possible de diminuer ces atteintes oxydantes sur les gamètes, nous avons étudié les effets d'une supplémentation orale antioxydante sur des souris sauvages et sur l'un de nos modèles murins mutant.

Mots-clés : reproduction ; épидидyme ; ADN spermatique ; chromatine ; oxydation ; espèces oxygénées réactives

The spermatozoa acquire their fertilizing ability and their motility through the epididymis. Paradoxically, this epididymal maturation needs reactive oxygen species (ROS) to condense the sperm chromatin permitting to protect the DNA against these molecules. We studied how the epididymis ensure the equilibrium between deficit and excess of ROS by characterizing the epididymal phenotype of mice lacking two antioxidant activities of the glutathione peroxidase family, GPx5 & snGPx4. The epididymis of these mice produce a strong antioxidant response and also increase the disulfide bridging activity by adjusting the gene expression of antioxidant enzymes (Trx, Prx, GST, SOD3, catalase) and disulfide isomerase proteins (Pdia). This protection is efficient for tissue and sperm membranes but not for sperm chromatin which is susceptible to decondensation. The sperm cells show oxidative damage in the nucleus, which worsen with the decrease of the antioxidant activity upon aging. Immunological and biochemical approaches indicated that oxidative damage occurred only on the sperm DNA at the periphery of the nucleus, which is enriched with persisting nucleosomes and associated to the nuclear matrix. Finally, to determine if these oxidative damages on the spermatozoa can be lowered, we studied the effects of an oral antioxidant supplement on wild type and *gpx5*^{-/-} mice (Chabory *et al.*, 2009).

Key-words: reproduction; epididymis; sperm DNA; chromatin; oxidation; reactive oxygen species

INTRODUCTION

Le processus de la reproduction sexuée repose sur l'association de deux copies d'un même génome, l'une provenant de la mère et l'autre du père. Le génome est une sorte de plan de construction des différents composants de l'organisme, codé dans l'acide désoxyribonucléique (ADN). Il indique non seulement les éléments de chacun de ces composants et leur façon de s'associer, mais également où et quand les produire. La copie paternelle de ce génome est transportée au sein d'une cellule hautement différenciée, le spermatozoïde. Cette différenciation, se produisant lors de la spermatogenèse, entraîne de profondes modifications de la structure et de l'organisation de l'ADN, qui est alors associé sous forme de chromatine à des protéines nucléaires spécifiques des spermatozoïdes, les protamines. Ce remaniement permet une condensation très importante de la chromatine spermatique qui se poursuit ensuite dans l'épididyme, où sont maturés et stockés les gamètes. Ainsi, l'ADN portant le patrimoine génétique paternel est mieux protégé et le maintien de son intégrité assure un développement embryonnaire correct et une santé normale au futur nouvel individu. Le paradoxe est que la poursuite post-testiculaire de la condensation de la chromatine nécessite l'intervention d'espèces oxygénées réactives (EOR), qui sont justement l'une des principales menaces pouvant endommager l'ADN spermatique. En effet, l'unique enzyme actuellement connue permettant la poursuite de la condensation de la chromatine nucléaire lors de la descente épидидymaire est snGPx4 (Pfeifer *et al.*, 2001 ; Conrad *et al.*, 2005). Elle utilise les EOR pour réaliser des ponts disulfures entre les protamines, afin de compacter les brins d'ADN et de verrouiller dans un état condensé la structure de la chromatine spermatique. Or, en trop forte concentration, ces EOR peuvent être à l'origine d'une perte de fonction des spermatozoïdes et de mutations de l'ADN. L'environnement des gamètes doit donc ajuster la concentration en EOR de façon à permettre un niveau optimal d'oxydation tout en évitant de basculer dans le stress oxydant. Des travaux antérieurs de l'équipe ont conduit à l'identification de l'enzyme majeure de recyclage des EOR dans le fluide épидидymaire, la glutathion peroxydase 5 (GPx5). Cette enzyme sécrétée dans le fluide épидидymaire protège les gamètes en transit de la peroxydation et contribue à l'équilibre de la concentration luminale en EOR (essentiellement H₂O₂) disponible pour les événements de pontage disulfure nucléaires (Chabory *et al.*, 2009).

Afin de mieux comprendre l'importance de ce dialogue entre GPx5 et snGPx4 lors du processus de maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme, nous avons généré un modèle de souris invalidée pour les deux gènes correspondants. Une partie du travail qui m'a été confié au cours de cette thèse de doctorat a porté sur la caractérisation phénotypique de ce mutant avec des approches concentrées sur le phénotype tissulaire épидидymaire, le phénotype spermatique et la fonctionnalité des gamètes.

Ayant identifié à la fois dans le modèle *gp5^{-/-}* et le modèle *gp5;sn5^{-/-}* que le noyau spermatique présente des atteintes oxydantes significatives, j'ai cherché dans un deuxième temps à préciser la localisation des dommages oxydants dans la chromatine spermatique. Ce travail a été essentiellement conduit sur le modèle de souris *gp5^{-/-}*.

Enfin, dans une perspective plus appliquée, j'ai utilisé ce même modèle murin *gp5^{-/-}* pour tester l'efficacité d'une supplémentation orale antioxydante pour corriger les altérations oxydantes des gamètes. Ce type d'approche thérapeutique est classiquement utilisé en clinique de l'infertilité sans que la preuve de son efficacité et de son innocuité n'ait été apportée de façon convaincante.

En guise d'introduction bibliographique à ce travail j'ai choisi de synthétiser l'état de l'art en matière d'organisation du noyau spermatique. L'accent a été mis sur les particularités de cette organisation du noyau gamétique mâle chez les mammifères par rapport à l'organisation du noyau d'une cellule somatique, de son établissement jusqu'à la fin de la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes.

ÉTAT DE L'ART

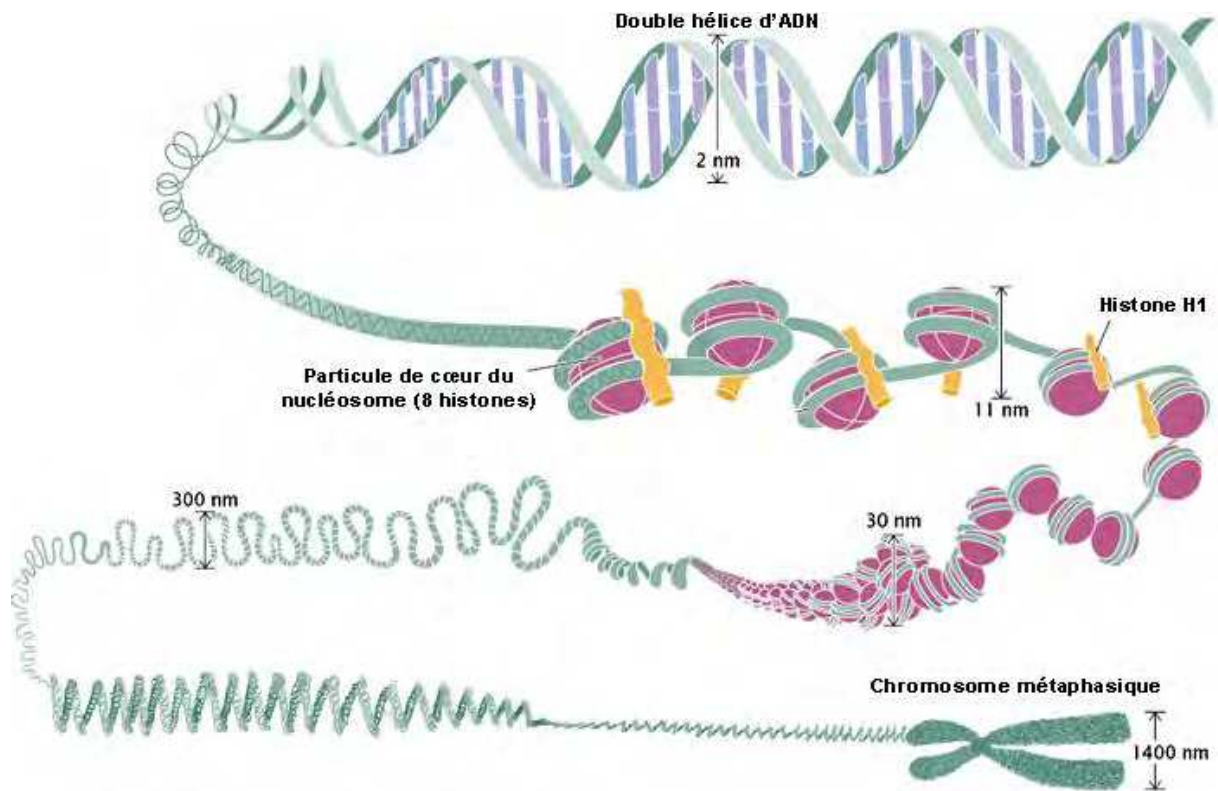


Figure 1 : De l'ADN à la chromatine

Ce schéma représente les différents niveaux d'organisation de la chromatine permettant sa compaction, de la fibre de 11 nm au chromosome métaphasique observé lors de la mitose (Modifié de Pray, 2008).

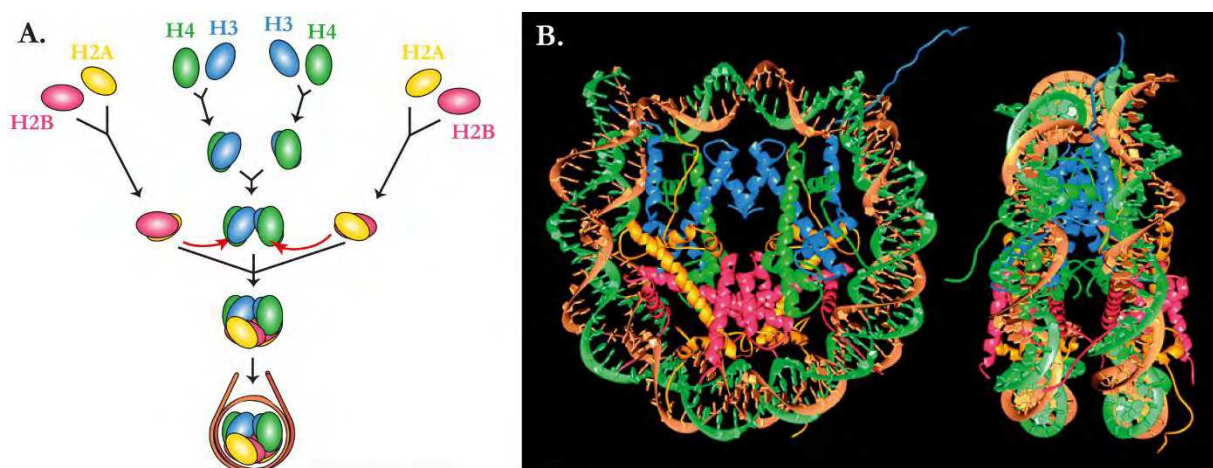


Figure 2 : Assemblage du nucléosome

Ces schémas représentent l'assemblage du nucléosome (A), de dimères d'histones en octamères, et de la modélisation de sa structure déterminée par cristallographie au rayons-X à une résolution de 2,8 Å (B ; Luger *et al.*, 1997).

I. L'organisation de la chromatine spermatique

1. La chromatine des cellules somatiques

a. L'organisation de la chromatine

Le bon fonctionnement de l'organisme repose sur le maintien de l'intégrité de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Cette longue molécule linéaire est en quelque sorte le plan de construction des protéines, ouvriers et maîtres d'œuvre des réactions chimiques réalisées au sein de tout organisme vivant. Pour conserver l'ADN intact tout au long de la vie cellulaire, il est protégé dans un compartiment particulier : le noyau. Seulement, comment faire tenir environ deux mètres d'ADN dans un espace de quelques micromètres ? De plus, tout en étant compacté, il doit pouvoir rester accessible aux différentes machineries cellulaires assurant sa réplication, sa transcription ou sa réparation.

Pour ce faire, l'ADN est associé à différentes protéines qui vont permettre son enroulement sur lui-même de façon ordonnée (figure 1). Son association avec ces protéines forme la chromatine. Elle possède une structure dynamique qui contrôle l'accessibilité des différents complexes protéiques à la séquence des nucléotides qui composent l'ADN. L'agencement de la chromatine en un point donné de la séquence, à un instant donné, permet donc de réguler l'expression des gènes.

➤ *L'unité de base de la chromatine : le nucléosome*

Dans les cellules somatiques, les protéines chargées d'organiser la compaction de l'ADN appartiennent à la famille des histones. Les histones sont de petites protéines très basiques, riches en résidus lysine et arginine. Cette composition particulière leur confère une charge globale positive qui va leur permettre d'interagir avec l'ADN chargé négativement, en raison des groupements phosphates composant le squelette sucré. L'association des histones avec l'ADN neutralise une grande partie des charges négatives et permet ainsi son repliement sur lui-même et donc sa compaction.

Les histones « de cœur » ont une taille allant de 11 à 14 kDa. Elles sont composées d'un domaine de type globulaire et d'une queue sans structure définie dans leur partie amino-terminale. Le domaine globulaire, appelé *histone fold*, est une succession de trois hélices α séparées par deux boucles. Ce domaine est le site d'interaction des histones entre elles. Grâce à lui, les histones H3 et H4 forment un hétérotétramère, tandis que les histones H2A et H2B s'associent en hétérodimère. Puis, un tétramère d'H3/H4 et deux dimères d'H2A/H2B s'assemblent en un octamère, formant ce qu'on appelle la particule de cœur. Cette particule ressemble à un disque de 11 nm de diamètre et de 5,6 nm de hauteur, autour duquel s'enroule l'ADN, sans qu'il y ait de contact entre les bases de l'ADN et les histones. En effet, seul le squelette sucré et les phosphates de l'ADN interagissent directement avec les histones. Cet ensemble nucléoprotéique est appelé un nucléosome (figure 2).

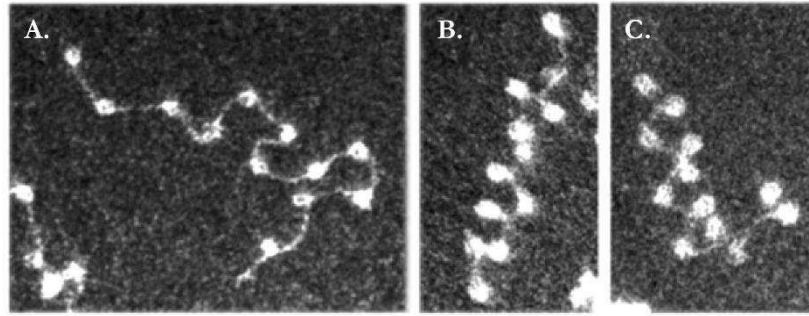


Figure 3 : Ultrastructure de la fibre de 11 nm

Ces micrographies montrent l'ultrastructure de nucléosomes reconstitués à partir d'histones de poulet, en absence (A) ou en présence (B, C) d'histone de liaison, par observation en microscopie électronique à transmission (Grigoryev *et al.*, 2009).

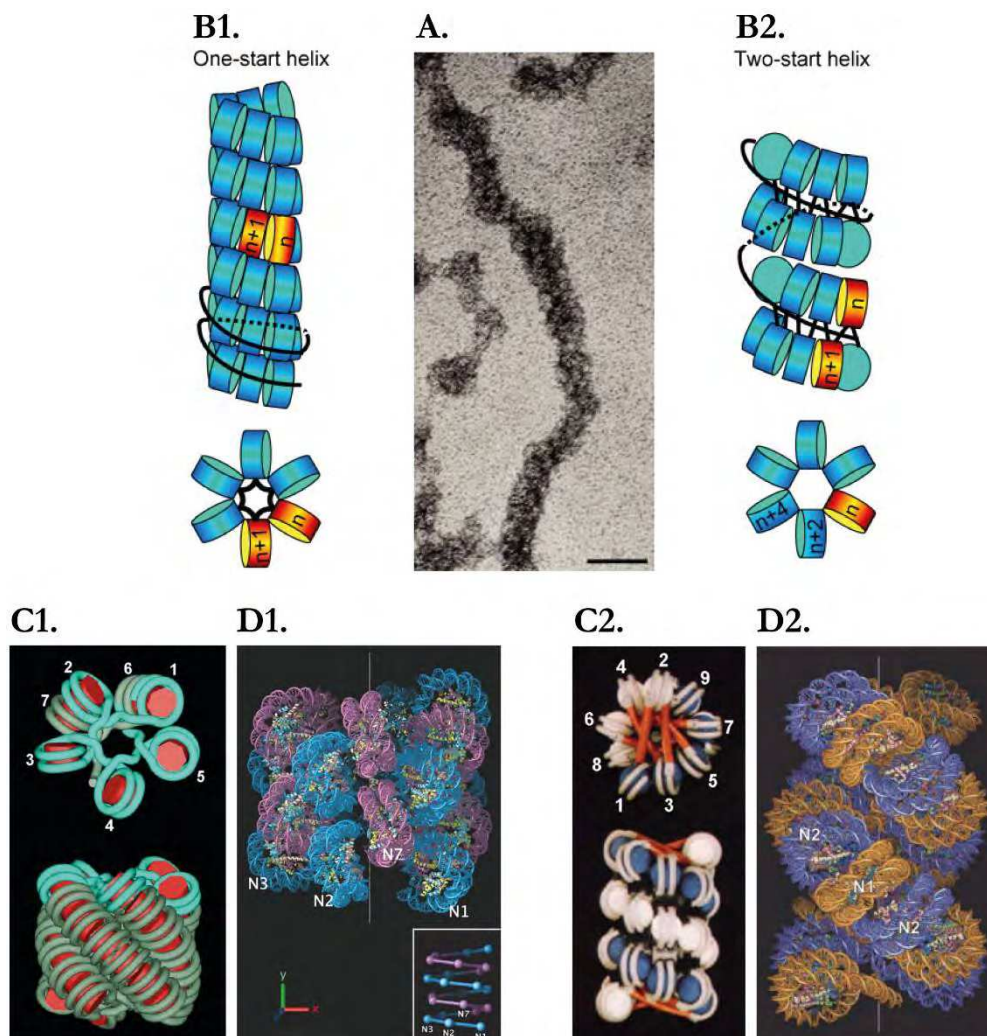


Figure 4 : La fibre de 30 nm

La structure de la fibre d'ADN de 30 nm, observée ici par microscopie électronique à transmission (A, Olins & Olins, 2003), fait l'objet d'un débat. Actuellement, deux principaux modèles, représentés schématiquement (B, van Holde & Zlatanova, 2007), s'affrontent : la structure en solénoïde ou « *one-start helix* » (C1, Daban & Bermúdez, 1998 ; D1, Robinson *et al.*, 2006) et la structure du zigzag en ruban ou « *two-start helix* » (C2, Williams *et al.*, 1986 ; D2, Schalch *et al.*, 2005).

➤ **Les différents niveaux d'organisation de la chromatine**

- La fibre de 11 nm

L'observation par microscopie électronique de la chromatine montre que la fibre de chromatine présente une structure dite « en collier de perles » (figure 3). L'ADN semble s'enrouler autour de particules sphériques : les octamères d'histones. Ceci permet l'organisation de la chromatine en une fibre de 11 nm de diamètre. Ce premier niveau d'organisation assure un raccourcissement de l'ADN à $1/6^{\text{ème}}$ de sa taille.

Lorsque la chromatine est digérée avec une endonucléase telle que la nucléase micrococcalle (MNase), des fragments d'ADN dont la taille est un multiple de 200 paires de bases (pb) sont générés. Cette taille minimale correspond à environ 2 tours d'ADN autour d'une particule de cœur. L'étude par cristallographie aux rayons X des nucléosomes a montré que l'ADN fait environ 1,7 tours de l'octamère d'histones — soit 146 pb. Entre deux nucléosomes, l'ADN dit « de liaison » mesure environ 50 pb bien que cette longueur soit très variable *in vivo*.

Il existe une cinquième histone de 23 kDa, H1. Sa structure est différente des histones de cœur. Ses extrémités carboxy- et amino-terminales positivement chargées entourent un domaine *Winged helix* de type globulaire. Selon l'absence ou la présence de H1, la structure du « collier de perles » varie. En absence de H1, les nucléosomes sont en enfilade. Alors qu'en présence de H1, les nucléosomes sont en zigzag (figure 3). Cette histone H1 est dite « de liaison » car elle interagirait avec l'ADN de liaison, terminant les 2 tours d'ADN autour de l'octamère et stabilisant le nucléosome. Sa présence n'est pas constante dans tout le génome, ce qui contribue à l'hétérogénéité structurale de la chromatine. Ainsi, les régions enrichies en H1 sont plus fortement compactées (Woodcock *et al.*, 2006).

- La fibre de 30 nm

Au niveau des nucléosomes, les queues amino-terminales des histones de cœur dépassent à l'extérieur de l'octamère. Elles sont impliquées dans l'interaction entre les nucléosomes et permettent un repliement de la fibre de 11 nm sur elle-même. Ce deuxième niveau d'organisation aboutirait à un raccourcissement de la fibre de 11 nm de 6 fois, qui formerait alors une fibre de 30 nm de diamètre.

Malgré près de 40 ans d'étude, la structure de cette fibre de 30 nm est encore très controversée. Ces dernières années, certaines équipes de recherche ont même avancé l'idée qu'elle n'existerait pas *in vivo* : elle ne serait qu'un artefact expérimental dû au fait de travailler sur des fragments de chromatine très dilués, souvent reconstitués et avec une longueur d'ADN de liaison constante (Eltssov *et al.*, 2008 ; Maeshima *et al.*, 2010 ; Fussner *et al.*, 2011). Cependant, deux principaux modèles — avec quelques variantes — s'affrontent et parfois cohabitent sous certaines conditions expérimentales, selon les techniques et les tampons employés (figure 4).

Le premier modèle est celui en « solénoïde » ou *one-start helix*. La fibre de 11 nm est linéaire et s'enroule en hélice. Le nucléosome est précédé du nucléosome n-1 et suivi du n+1. Le second modèle est celui du zigzag en ruban ou *two-start helix*. Les nucléosomes de la fibre de 11 nm s'organisent en zigzag, sur 2 rangs parallèles formant un « ruban » qui s'enroule en hélice. Le nucléosome est donc précédé de n-2 et suivi de n+2 (van Holde & Zlatanova, 2007 ; Daban, 2011).

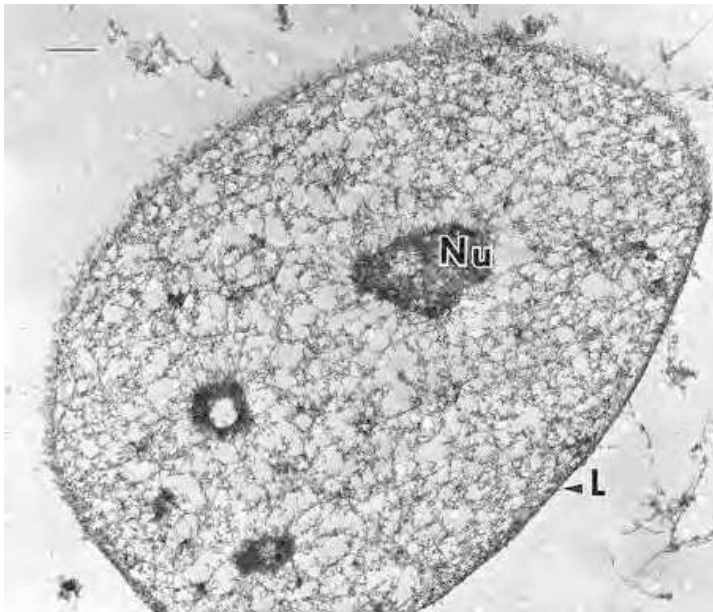
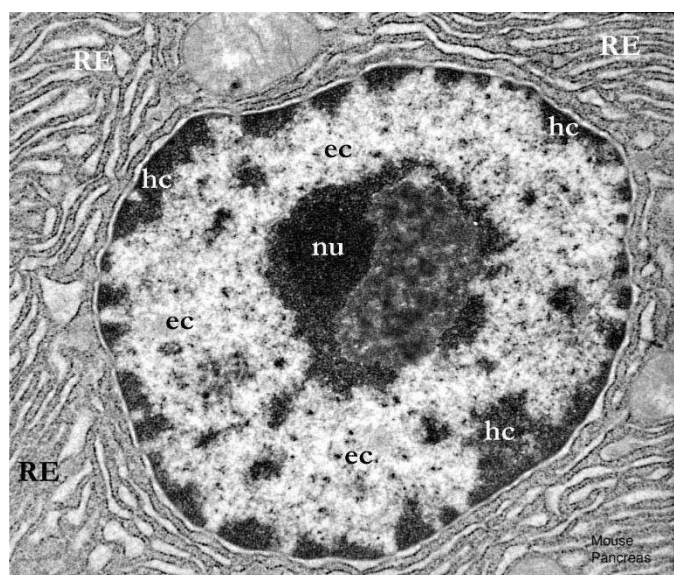


Figure 5 : La matrice nucléaire

La matrice nucléaire est composée de la lamina (L) et d'un réseau de protéines et d'ARN sous forme de fibres d'environ 10 nm de diamètre. Elle est ici observée par microscopie électronique dans des cellules CaSki. Nu : nucléole. Échelle : 1 μ m. (Nickerson *et al.*, 1997).

Figure 6 : L'hétérogénéité de la chromatine d'une cellule somatique

La chromatine du noyau d'une cellule somatique (ici, de pancréas de souris) présente un aspect hétérogène lorsqu'elle est observée par microscopie électronique à transmission. ec : euchromatine ; hc : hétérochromatine ; nu : nucléole ; RE : réticulum endoplasmique. (Microscopy & Imaging Facility, Hamilton College, Clinton, NY, USA)



- La fibre de 300 nm

Cette fibre de 30 nm se replierait ensuite en larges boucles de 50 à 200 kb, dont la base serait fixée à une matrice protéique. La fibre de chromatine formée par ces boucles liées à la matrice nucléaire possède un diamètre de 300 nm. Sa structure tridimensionnelle exacte n'est pas connue car elle est peu accessible avec les moyens techniques actuels.

La matrice nucléaire est un ensemble ribonucléoprotéique (lamine B, facteurs de transcription, topoisomérases II, ARN...), qui forme un réseau fibreux à l'intérieur du noyau et est lié à la membrane nucléaire (figure 5). Elle permettrait aux fibres de la chromatine de s'organiser de façon stable à l'intérieur du noyau selon les trois dimensions et semble impliquée dans la réplication, la régulation de la transcription et la maturation des ARN (Blencowe *et al.*, 1994 ; Chattopadhyay & Pavithra, 2007 ; Gluch *et al.*, 2008). La fixation de la chromatine sur la matrice nucléaire se fait par l'intermédiaire de séquences d'ADN spécifiques appelées *scaffold* ou *matrix attachment regions* (S/MAR). Ces séquences d'environ 200 pb ne sont pas toutes identiques et présentent même peu d'homologie. Cependant, elles semblent posséder certaines caractéristiques communes, ou tout du moins fréquentes. Ainsi, elles sont riches en AT, ce qui semble limiter l'enroulement en hélice de l'ADN, et sont plus sensibles que le reste du génome à la DNase I. Elles sont souvent situées près de séquences régulatrices capables de fixer des facteurs de transcription et contiennent souvent des sites d'origine de réplication, des séquences de recrutement des topoisomérases II et des séquences répétées inversées. Cet ensemble de propriétés permet aux S/MAR d'organiser la chromatine en régions distinctes, isolées les unes des autres par ces sites de fixation à la matrice nucléaire, formant alors des unités fonctionnelles lors de la transcription des gènes et de la réplication de l'ADN. Ceci semble d'autant plus vrai que des protéines recrutées par ces sites de fixation jouent un rôle important dans le remodelage de la chromatine et la régulation de la transcription des gènes (Chattopadhyay & Pavithra, 2007).

- Le chromosome métaphasique

Le niveau d'organisation le plus compact de la chromatine est observé lors de la métaphase, durant la mitose des cellules. Il serait obtenu par l'enroulement des fibres de 300 nm sur elles-mêmes. L'ADN linéaire est alors compacté environ 10 000 fois.

➤ ***L'hétérogénéité du noyau***

En microscopie électronique à transmission (MET), la chromatine du noyau présente des zones de densité variable (figure 6). Ces zones sont séparées en fonction de la chromatine contenue. D'une part, l'euchromatine correspond à des régions d'ADN peu condensées et claires en MET, qui sont généralement situées vers le centre du noyau. Cette faible compaction permet une meilleure accessibilité des complexes protéiques à l'ADN. Ces régions génomiques sont donc généralement transcriptionnellement actives. D'autre part, l'hétérochromatine est très condensée et plus proche de la membrane nucléaire. Elle apparaît sombre lors de l'observation d'un noyau en MET. La transcription des gènes y est très réprimée grâce à l'inaccessibilité de l'ADN. L'hétérochromatine elle-même est subdivisée en deux parties. On distingue en effet l'hétérochromatine facultative de l'hétérochromatine constitutive. La première est dynamique et varie selon le stade de différenciation et le type cellulaire alors que la seconde est permanente et identique dans tous les types cellulaires. Cette dernière permet de maintenir la stabilité du génome en gardant inactifs les éléments transposables.

b. Le remodelage de la chromatine

Comme l'indique la notion d'hétérochromatine facultative, les cellules ne sont pas figées. Elles évoluent en fonction de leur stade de différenciation et doivent être capables de répondre très rapidement à un stress ou à un messenger en provenance de leur environnement. Pour cela, l'ADN doit pouvoir passer en très peu de temps d'un état accessible à inaccessible, et inversement. La chromatine est donc dynamique et non statique, passant d'une conformation ouverte comme l'euchromatine à une conformation condensée telle que l'hétérochromatine et inversement, contrôlant ainsi l'accessibilité à la séquence de l'ADN.

Il existe différents mécanismes de remodelage de la chromatine qui interagissent entre eux. La conformation de la chromatine étant basée sur l'interaction entre l'ADN et les histones, le remodelage de la chromatine fait intervenir des modifications chimiques de ces deux molécules, sans pour autant modifier la séquence nucléotidique de l'ADN. Les variations d'affinité obtenues sont observées à différents niveaux : entre les histones et l'ADN, entre différentes histones, et vis-à-vis des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, la réparation ou la transcription.

➤ *La modification des nucléosomes*

- *L'incorporation de variants d'histones*

Le moyen le plus efficace et radical pour faire varier l'affinité entre l'ADN et le nucléosome est probablement d'échanger une histone avec une autre au sein de la particule de cœur. En effet, il existe des protéines homologues aux histones dites « canoniques ». Ces protéines sont des variants d'histones, codés par un gène qui leur est propre. L'identité de séquence entre ces variants et leur homologue canonique est très variable. Le variant H3.3 ne possède que quatre résidus différents de l'histone H3, ce qui correspond à une identité de 96 %. Un autre variant de H3, *centromere-specific protein A* (CENP-A), possède deux domaines : une partie carboxy-terminale avec un domaine *histone fold* qui présente 62 % d'identité avec H3 et une partie amino-terminale qui ne présente d'homologie avec aucune histone (Sullivan *et al.*, 1994). Au final, CENP-A présente donc seulement 46 % d'identité avec H3.

Ces variations dans leur séquence en acides aminés leur donnent une structure différente des histones canoniques et leur confèrent des propriétés physico-chimiques spécifiques. Ces propriétés semblent leur permettre d'acquérir des fonctionnalités biologiques différentes des histones canoniques.

Le variant CENP-A est principalement retrouvé dans le centromère des chromosomes. La génération de souris dont le gène codant pour CENP-A a été invalidé, a montré que l'absence totale de CENP-A était létale pour les embryons homozygotes à 6,5 jours après la conception, à cause d'une mauvaise ségrégation des chromosomes (Howman *et al.*, 2000). Il semble que CENP-A recrute des protéines du kinétochore de façon à initier son assemblage avec le centromère puis à le stabiliser (Guse *et al.*, 2011). La surexpression de CENP-A a aussi été associée à différents cancers (Tomonaga *et al.*, 2003 ; Wu *et al.*, 2012), où il semble que CENP-A et d'autres protéines importantes dans l'association du kinétochore sont retrouvées en dehors du centromère lors de la



Figure 7 : Les principales modifications post-traductionnelles des histones

Les principales modifications post-traductionnelles des histones canoniques humaines sont représentées sur la séquence de leur queue carboxy-terminale : acétylation (bleu), méthylation (rouge), phosphorylation (jaune) et ubiquitination (vert). Les nombres en gris sous la séquence des histones représentent la position des résidus modifiés (Portela & Esteller, 2010).

Modification post-traductionnelle	Réaction	Cible(s)	Enzymes
Acétylation	Ajout $-\text{CO}-\text{CH}_3$	Lysine	HAT (GNAT, MYST, p300, CBP)
β -N-Acétyl-glucosamination	Ajout $-\text{O}-\text{GlcNAc}$	Sérine, Thréonine	O-GlcNAc transférase
ADP ribosylation	Ajout $-(\text{ADP ribosyl})_n$	Lysine	PARP
Butyrylation	Ajout $-\text{CO}-\text{C}_3\text{H}_7$	Lysine	p300, CBP
Citrullination/déimination	Conversion $=\text{NH}_2^+$ en $=\text{O}$	Arginine	PADI4
Crotonylation	Ajout $-\text{CO}-\text{C}_3\text{H}_5$	Lysine	?
Formylation	Ajout $-\text{CH}=\text{O}$	Lysine	?
Hydroxylation	Ajout $-\text{OH}$	Tyrosine	?
Isomérisation de la proline	Isomérisation <i>cis/trans</i>	Proline	Proline isomérases
Méthylation	Ajout $-\text{CH}_3$	Lysine, Arginine	HMT, PRMT
Phosphorylation	Ajout $-\text{PO}_4$	Sérine, Thréonine	Kinases
Propionylation	Ajout $-\text{CO}-\text{C}_2\text{H}_5$	Lysine	p300, CBP
Sumoylation	Ajout $-(\text{SUMO})_n$	Lysine	Isopeptidase, Enzymes SUMO E1 & SUMO E2
Ubiquitylation	Ajout $-(\text{Ubiquitine})_n$	Lysine	Enzymes E1, E2, E3

Tableau 1 : Les modifications biochimiques des histones

mitose. Ces centromères ectopiques seraient alors à l'origine de l'instabilité du génome de ces cellules cancéreuses.

Alors que les histones canoniques ne sont synthétisées qu'au cours de la phase S de la réplication, la synthèse du variant H3.3 n'est pas restreinte à une phase du cycle cellulaire. Ainsi, lorsque certaines histones H3 sont retirées au passage de la machinerie de transcription, elles sont ensuite remplacées par H3.3. Les gènes transcriptionnellement actifs sont donc enrichis en H3.3. Les nucléosomes comportant ce variant ont par ailleurs été montrés comme moins stables que ceux composés de H3. Ceci pourrait participer à un maintien de l'ouverture de la chromatine pour ces gènes.

- Les modifications post-traductionnelles des histones

Les histones et leurs variants peuvent subir des modifications post-traductionnelles covalentes de différents types. Ces modifications entraînent des changements de propriétés physico-chimiques des histones liées à l'ADN. Ainsi, des variations de leur affinité avec celui-ci ou avec d'autres protéines s'y fixant sont observées, permettant des changements de conformation de la chromatine.

Ces modifications post-traductionnelles touchent toutes les histones, y compris H1. Elles ont principalement lieu sur la queue amino-terminale, bien que le domaine globulaire puisse également être concerné. À ce jour, quatorze réactions de modifications des histones ont été identifiées, certaines d'entre elles peuvent être réalisées sur un même résidu et sont alors mutuellement exclusives (figure 7 ; tableau 1) (Chen *et al.*, 2007 ; Sakabe *et al.*, 2010 ; Tan *et al.*, 2011).

Une même histone peut voir plusieurs de ses résidus modifiés simultanément et l'ajout d'un groupement chimique sur un même résidu peut être unique, double ou triple. Une grande variabilité d'effets biologiques est observée en fonction des résidus modifiés et du type de modification. Par ailleurs, ces modifications sont réversibles pour plusieurs d'entre elles, apportant une grande plasticité à la chromatine. Ceci confère aux cellules une importante capacité d'adaptation face à leur environnement.

L'acétylation

L'acétylation des histones consiste à ajouter un groupement acétyle ($-\text{COCH}_3$) sur une lysine (K) (figure 8A). Cette réaction est catalysée par des enzymes histone acétyl transférases (HAT) qui utilisent l'acétyl-co-enzyme A comme donneur. Ces enzymes sont souvent associées à des complexes qui permettent de les stabiliser et de leur donner une spécificité d'action. L'ancienne classification est basée sur leur localisation et leur fonction. Ainsi, les HAT de type A sont nucléaires et acétylent les histones déjà en place sur l'ADN, tandis que les HAT de type B sont cytoplasmiques et acétylent les histones nouvellement synthétisées, provoquant leur transfert dans le noyau et leur dépôt sur l'ADN. Dans la classification moderne, elles sont groupées selon leur structure : les *Gcn5-related N-acetyltransferases* (GNAT), les *MYST-related HATs* (**MOZ**, **Ybf2/Sas3**, **Sas2**, **TIP60**) et les p300/CBP HAT (*E1A-binding protein*, 300kD/*CREB binding protein*). La réaction inverse de retrait du groupement acétyle est catalysée par les histone désacétylases (HDAC).

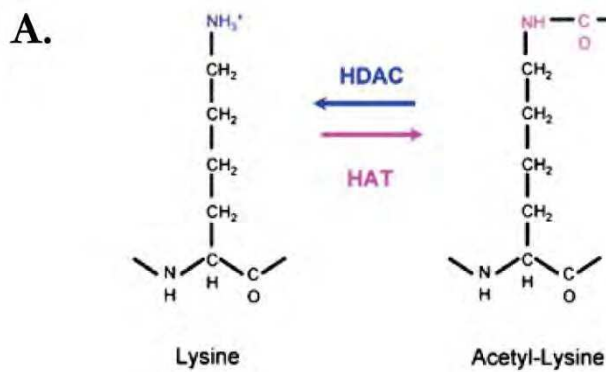


Figure 8 : Le mécanisme de l'acétylation des histones

- A. Réactions d'acétylation et de désacétylation de la lysine.
- B. La balance entre acétylation et désacétylation des histones règle l'expression des gènes (Adcock *et al.*, 2004).

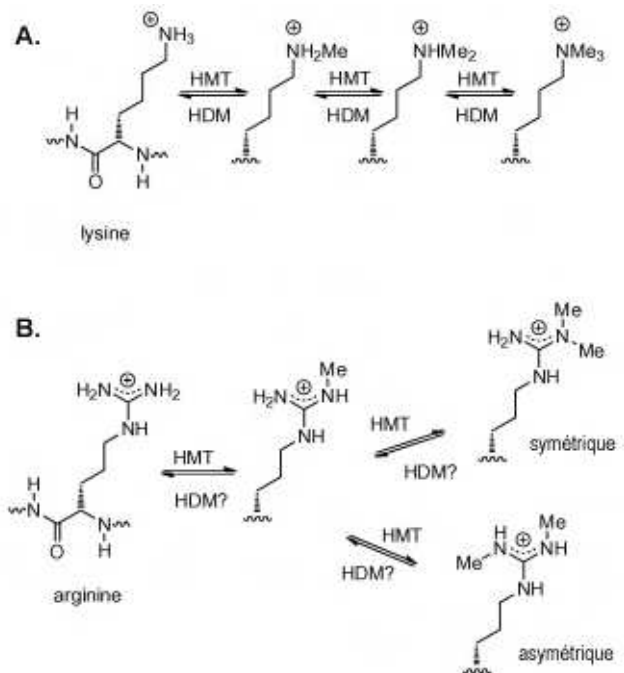
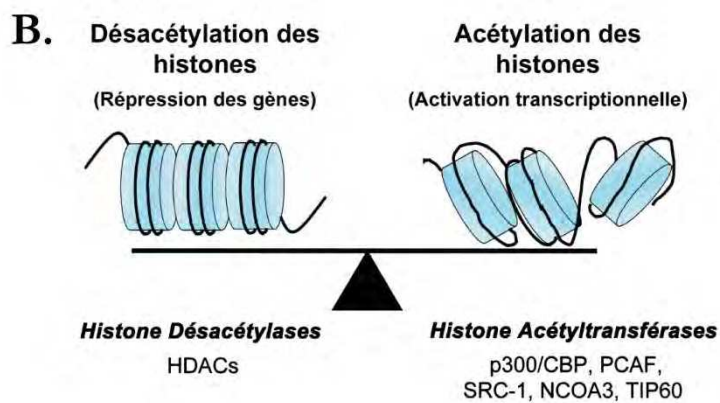


Figure 9 : La méthylation des histones

Réactions de méthylation de la lysine (A) et de l'arginine (B) sur les histones.

L'acétylation des histones joue un rôle dans l'activation de la transcription en permettant l'ouverture de la chromatine (figure 8B). Elle est donc généralement associée à l'euchromatine. En effet, l'ajout d'un groupement acétyle sur la lysine enlève une charge négative sur la queue amino-terminale ou la partie globulaire de l'histone. Ceci peut être à l'origine d'une diminution de l'affinité entre le nucléosome et l'ADN négativement chargé, mais également d'une répulsion entre des nucléosomes voisins. Le relâchement de la chromatine permet alors à différents facteurs activateurs ou à la machinerie de transcription d'atteindre plus aisément l'ADN de cette région. De plus, les histones acétylées peuvent recruter spécifiquement des protéines régulatrices de la transcription *via* leur bromodomaine qui peut se fixer aux lysines acétylées. En ouvrant la chromatine, les histones acétylées peuvent également faciliter la détection de signaux de dommages à l'ADN, comme par exemple à l'endroit des cassures doubles brins (DSB ou *double strand break*), et donc le recrutement des complexes de réparation de l'ADN (Murr *et al.*, 2006).

La méthylation

Les lysines et arginines des histones peuvent également être méthylées. Cette réaction consiste à ajouter un ou plusieurs groupements méthyles ($-CH_3$) sur l'azote de la chaîne latérale de ces résidus. La lysine (K) peut être mono-, di- ou tri-méthylée, tandis que l'arginine (R) peut être mono- ou di-méthylée, symétriquement ou asymétriquement (figure 9). Les enzymes qui catalysent cette réaction sont des histone méthyltransférases (HMT) et peuvent être réparties en 3 classes : les HMT à domaine SET (**S**uv39/**E**z/**T**rx) spécifiques des lysines, les HMT sans domaine SET spécifiques des lysines et les arginine méthyltransférases (RMT). Les enzymes chargées du retrait des groupements méthyles n'ont été découvertes que durant les dix dernières années. Elles sont pour l'instant classées en fonction de leur substrat (K ou R) et des domaines qu'elles contiennent. La première des lysine déméthylases (KDM) a été décrite en 2004 (Shi *et al.*, 2004). Il s'agit de LSD1 (*lysine-specific demethylase 1*) qui utilise la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme co-facteur pour déméthyliser la lysine. Une autre KDM utilisant le même cofacteur a été récemment découverte, LSD2, formant la première classe de KDM (Karytinis *et al.*, 2009). La deuxième classe de KDM est composée de protéines contenant un domaine Jumonji (JmjC) qui, par homologie de séquence, a permis de mettre à jour un nombre important de KDM. Pour ce qui est de la classe des arginine déméthylases (RDM), Jmjd6 a été présentée en 2007 comme capable de déméthyliser H3R2me et H4R3me (Chang *et al.*, 2007), bien que ce fait n'ait pas pu être vérifié depuis (Han *et al.*, 2012). Par ailleurs, il semble que l'arginine méthylée puisse être convertie en citrulline par Padi4 (*protein arginine deiminase 1 4*) mais cette protéine ne peut pas être considérée comme une RDM à part entière.

Le rôle de la méthylation des histones dans la transcription est bien plus complexe que celui de l'acétylation. En effet, pour une même histone, selon le résidu modifié et le nombre de méthylations, la transcription pourra être activée ou réprimée. Ainsi, H3K4me est principalement associée aux régions génomiques transcriptionnellement actives, tandis que H3K27me et H3K20me sont généralement associées à des régions transcriptionnellement réprimées. D'autre part, certaines modifications sont retrouvées indifféremment dans les régions actives et réprimées, comme H3K9me. Pour compliquer encore le problème, dans les cellules souches embryonnaires (cellules ES), certains gènes présentent à la fois des modifications activatrices et des modifications répressives : on parle alors de domaines bivalents. Dans le cas de la méthylation des arginines, il semble que ce soit l'enzyme RMT qui détermine si la modification est activatrice (RMT de type I) ou inhibitrice (RMT de type II) de la transcription (Wysocka *et al.*, 2006).

La méthylation des histones joue également un rôle dans la réparation de l'ADN. En effet, H4K20me est retrouvée au niveau des sites de DSB. Cette histone modifiée serait reconnue par la protéine Crb2 (*crumbs homolog 2 (Drosophila)*) qui déclencherait alors l'arrêt du cycle cellulaire entre les phases G2 et M, le temps de réparer les cassures de l'ADN (Sanders *et al.*, 2004).

La phosphorylation

La phosphorylation des protéines consiste à ajouter un groupement phosphate ($-PO_4$) sur un résidu sérine (S) ou tyrosine (Y) par une protéine kinase. Le retrait de ce groupement se fait par les enzymes phosphatases.

La phosphorylation de H3S10 (H3S10p) a très vite été associée à la condensation des chromosomes lors des phases de mitose et méiose (Gurley *et al.*, 1978 ; Wei *et al.*, 1998). On s'attendrait donc à ce que H3S10p soit impliquée dans la répression de la transcription. Or, elle est au contraire associée à des régions transcriptionnellement actives chez différentes espèces : les gènes de la famille *Heat Shock Protein* chez la drosophile (Nowak & Corces, 2000), les gènes cibles de NF κ B chez la souris (Yamamoto *et al.*, 2003).

La phosphorylation d'un variant d'histone est impliquée dans la réparation de l'ADN. Cette protéine est H2A.X, variant de H2A, et est constitutivement phosphorylée sur la tyrosine Y142. Ce variant est distribué dans tout le génome sans distinction, mais lorsqu'une cassure double brin de l'ADN se produit, les variants H2A.X sont phosphorylés sur la sérine S129 et déphosphorylés sur Y142, jusqu'à plusieurs kilobases (levure) ou mégabases (mammifères) de la cassure. Cette nouvelle forme du variant est appelée γ -H2A.X. Les protéines de réparation seraient maintenues en complexes autour du DSB durant la réparation de l'ADN grâce à leur interaction avec γ -H2A.X (Celeste *et al.*, 2003).

Les autres modifications des histones

Il existe d'autres modifications post-traductionnelles des histones et de leurs variants (tableau 1). Elles ne sont pas toutes aussi bien étudiées les unes que les autres et il est fort possible que la liste de ces modifications soit encore complétée dans les années à venir.

On peut noter, entre autres, l'ubiquitination qui consiste à ajouter une ou plusieurs ubiquitines (76 acides aminés) sur les histones et qui est réversible. Bien qu'habituellement l'ubiquitination des protéines soit l'initiation de leur voie de dégradation, en ce qui concerne les histones, ce n'est pas le cas. Le rôle de cette modification est cependant ambigu puisqu'une même histone ubiquitinylée peut être retrouvée dans les régions à la fois transcriptionnellement actives et réprimées (Zhang, 2003).

Parmi les autres modifications découvertes se trouvent la sumoylation, l'ADP-ribosylation, l'isomérisation de la proline... Cependant, les mécanismes impliqués sont moins connus et n'interviennent pas de façon importante durant la spermatogenèse. Nous ne les verrons donc pas en détail.

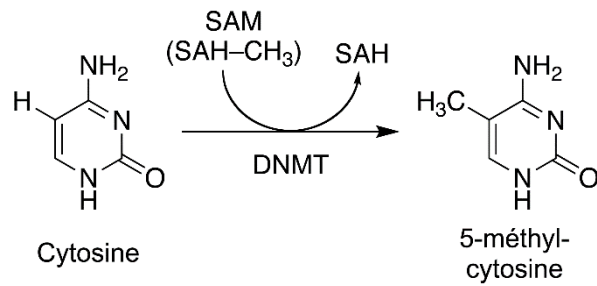


Figure 10 : La réaction de méthylation de l'ADN

Les enzymes DNMT catalysent l'ajout d'un groupement méthyl sur la base azotée cytosine de l'ADN. SAM : S-adenosyl-L-méthionine.

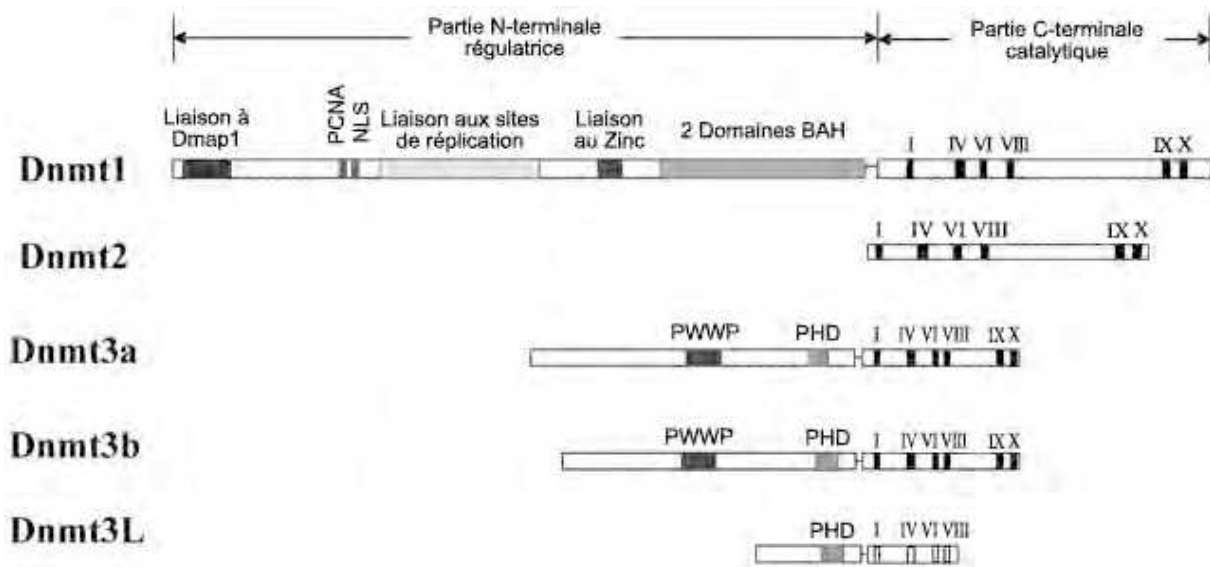


Figure 11 : La famille des ADN méthyltransférases (Dnmt)

Les domaines conservés du site catalytique sont numérotés en chiffres romains. BAH : *Bromo-adjacent homolog* ; Dmap1 : *DNA methyltransferase 1 associated protein 1* ; NLS : *nuclear localization sequence* ; PCNA : domaine de liaison à *Proliférating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) ; PHD : domaine *Plant Homeodomain* ; PWWP : domaine conservé « Proline-Tryptophane-Tryptophane-Proline » (Hermann *et al.*, 2004).

➤ La méthylation de l'ADN

L'ADN lui-même peut être modifié sans pour autant changer de séquence nucléotidique. Il s'agit d'ajouter un groupement méthyle sur une base azotée. Le plus souvent, la méthylation se produit sur le carbone 5 d'une cytosine (C). Dans 90 % des cas, cette cytosine est suivie d'une guanine (G) et, ces deux bases étant complémentaires, les cytosines des deux brins sont généralement méthylées. Seul environ 10 % des séquences CG sont hémi-méthylées, selon les types cellulaires (Arand *et al.*, 2012). Les séquences CG (notées CpG) méthylées peuvent être dispersées dans le génome mais il existe des régions très riches en séquences CpG. On appelle ces régions des îlots CpG. Ils se situent souvent en amont d'un gène, dans la région promotrice. Environ 60 % des gènes des mammifères seraient sous le contrôle d'un promoteur riche en séquences CpG.

La méthylation de l'ADN est réalisée par une famille de cinq enzymes, les ADN méthyltransférases (Dnmt), qui comprend Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b et Dnmt3L. Chacune de ces protéines a une fonction bien spécifique. Les enzymes réalisent la méthylation en sortant la base azotée à l'extérieur de la double hélice d'ADN puis en ajoutant par covalence un groupement méthyle à partir de la S-adénosyl-L-méthionine (figure 10).

La méthylation *de novo* est réalisée par Dnmt3a et Dnmt3b qui possèdent une structure très proche avec une partie amino-terminale variable, deux domaines de fixation à l'ADN et un domaine catalytique méthyltransférase dans la partie carboxy-terminale. Dnmt3L a la particularité d'avoir une séquence en acides aminés très proche de Dnmt3a et Dnmt3b mais elle ne possède ni la partie amino-terminale ni le premier site de fixation à l'ADN et la séquence du site catalytique n'est pas assez conservée pour que celui-ci soit actif (figure 11). Dnmt3a et Dnmt3b ont toutes les deux besoin de former un complexe avec Dnmt3L pour augmenter leur activité de méthylation.

La méthylation *de novo* a principalement lieu lors de la différenciation des cellules germinales et lors du développement embryonnaire. Ainsi, l'inactivation du gène codant pour Dnmt3a chez la souris est létale environ 4 semaines après la naissance, tandis que pour Dnmt3b, l'inactivation est létale pour l'embryon avant E11,5 (Okano *et al.*, 1999). L'inactivation du gène codant pour Dnmt3L montre que cette enzyme n'est pas essentielle pour le développement embryonnaire mais elle l'est pour le bon déroulement de la spermatogenèse et la mise en place de l'empreinte maternelle lors de l'ovogenèse (Hata *et al.*, 2002). Dnmt3a semble plus impliquée dans la méthylation des séquences promotrices, tandis que Dnmt3b serait plutôt affectée à la méthylation des séquences satellites centromériques. La famille des Dnmt3 dans son ensemble est également requise pour la méthylation *de novo* des cytosines non CpG, qui sont principalement des séquences CpA (Arand *et al.*, 2012).

Dnmt1 est, elle, impliquée dans le maintien de la méthylation pendant la réplication et la réparation de l'ADN. En effet, en son absence, le brin complémentaire synthétisé n'est pas méthylé et au fur et à mesure des divisions, la méthylation de l'ADN est perdue. Le rôle de Dnmt1 est donc de transmettre le profil de méthylation de cellule-mère en cellules-filles en méthylant le brin complémentaire au niveau des séquences CpG. Le profil de méthylation d'un type cellulaire est ainsi globalement stable au cours du vieillissement des tissus.

Dnmt2 est une enzyme qui est restée pendant longtemps très mystérieuse. Elle a été découverte en tant qu'homologue des autres Dnmt mais sa ou ses fonction(s) sont longtemps

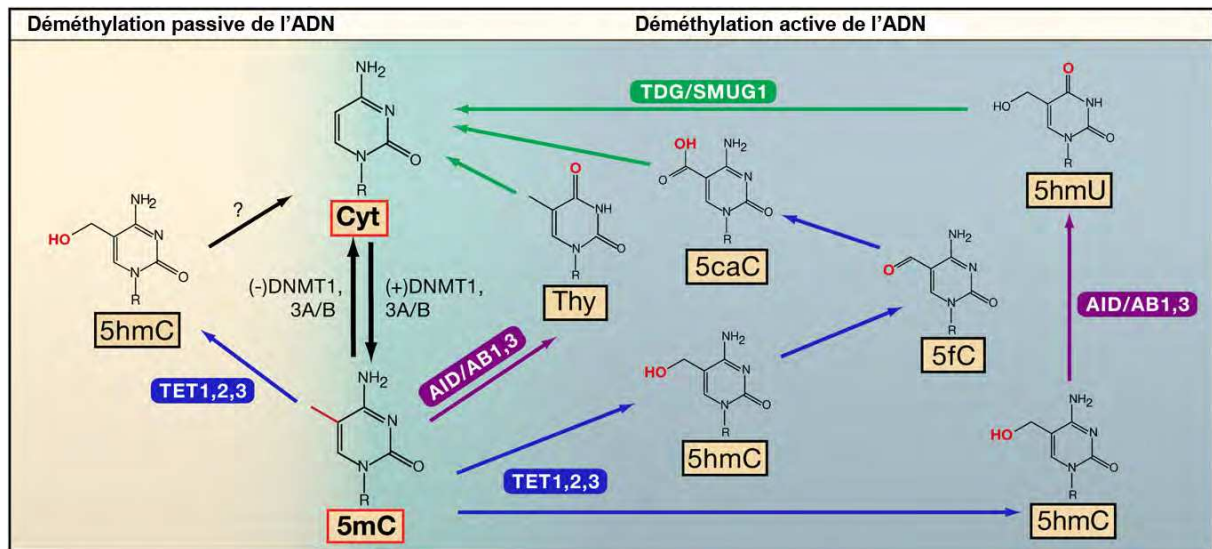


Figure 12 : Les voies possibles de déméthylation de l'ADN chez les mammifères

La déméthylation de l'ADN peut être passive : elle résulte alors de l'absence d'activité des enzymes Dnmt, associée à des cycles de mitose permettant une dilution des cellules initiales dont l'ADN est méthylé au milieu des cellules-filles. Jusqu'ici, aucune voie directe de déméthylation n'a été découverte chez les mammifères. Différentes familles d'enzymes capables de modifier la 5-mC ont été identifiées : les *ten-eleven translocation* (TET ; hydroxylation ; bleu) et les *activation-induced cytidine deaminase* (AID)/*apolipoprotein B mRNA editing enzyme cytidine deaminase* (APOBEC) (déimination ; violet). Les nouvelles bases azotées ainsi obtenues causeraient un mésappariement des brins complémentaires de l'ADN. Une fois détecté, ce mésappariement serait réparé par excision de base (BER ou *base excision repair* ; vert) via des enzymes uracile ADN glycosylases (UDG), comme la *thymine-DNA glycosylase* (TDG) et la *single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase* (SMUG1). 5mC : 5-méthylcytosine ; 5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine ; 5fC : 5-formylcytosine ; 5caC : 5-carboxylcytosine ; 5mU : 5-méthyluracile ; 5hmU : 5-hydroxyméthyluracile (Bhutani *et al.*, 2011).

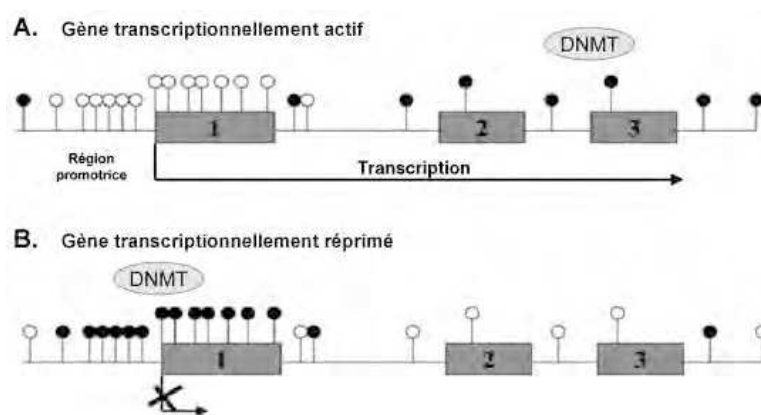


Figure 13 : La répartition de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est répartie différemment entre les gènes transcriptionnellement actifs et inactifs. Les cytosines méthylées (marques noires), qui entraînent une conformation fermée de la chromatine, seront localisées dans le promoteur et le premier exon des gènes réprimés pour empêcher toute fixation du complexe de transcription et des *enhancers*. Au niveau des gènes actifs, les cytosines méthylées sont situées dans la partie transcrite des gènes. Marques blanches : cytosines non méthylées (De Fraipont & Richard, 2009).

restées énigmatiques. En effet, les premiers travaux portant sur Dnmt2 n'ont pu mettre en évidence aucune activité enzymatique ADN méthyltransférase, malgré une très grande conservation des séquences d'acides aminés des motifs catalytiques nécessaires à cette activité (Okano *et al.*, 1998 ; Van den Wyngaert *et al.*, 1998 ; Yoder & Bestor, 1998 ; Dong *et al.*, 2001). Depuis, d'autres études ont montré que cette enzyme possède bien une activité ADN méthyltransférase, mais que celle-ci est très faible par rapport aux autres enzymes de la famille des Dnmt (Hermann *et al.*, 2003 ; Kunert *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2003). Ainsi, il a été proposé que Dnmt2 interviendrait dans la méthylation des cytosines non CpG (Kunert *et al.*, 2003). De plus, Phalke *et al.* ont démontré que Dnmt2 jouait un rôle important dans la répression des rétrotransposons au sein du génome des drosophiles (Phalke *et al.*, 2009). Ce phénomène a également été observé chez l'amibe (Kuhlmann *et al.*, 2005). Par ailleurs, Dnmt2 a été montrée comme capable de méthyle la cytosine de l'anti-codon de l'ARNt de l'aspartate (Goll *et al.*, 2006) et, depuis, il en est de même pour les ARNt de la valine et de la glycine (Schaefer *et al.*, 2010). Chez la levure et la drosophile, l'action de Dnmt2 sur les ARNt semble intervenir lors d'un stress cellulaire (Schaefer *et al.*, 2010 ; Thiagarajan *et al.*, 2011), peut-être en protégeant ces ARNt contre le clivage (Schaefer *et al.*, 2010).

La méthylation de l'ADN est réversible mais les mécanismes de déméthylation de l'ADN suscitent encore beaucoup de questions. Comme évoqué auparavant, la déméthylation peut être passive, en ne méthylant pas le brin d'ADN complémentaire synthétisé à chaque réplication ou réparation. Ainsi, au cours des divisions cellulaires, les cellules à l'ADN hémi-méthylé sont diluées dans la masse de nouvelles cellules non méthylées. Un mécanisme possible d'inhibition de Dnmt1 passerait par la modification des 5-méthylcytosines (5-mC) en 5-hydroxyméthylcytosines (5-hmC). En effet, Valinluck et Sowers ont étudié les effets de différentes modifications des 5-mC et seule l'oxydation inhibe Dnmt1 (Valinluck & Sowers, 2007). L'oxydation des 5-mC en 5-hmC serait catalysée par les enzymes de la famille des *ten-eleven translocation* (TET) (Tahiliani *et al.*, 2009 ; Ito *et al.*, 2010).

Cependant, la très rapide déméthylation de l'ADN observée dans le *pronucleus* paternel après la fécondation laisse penser qu'il existe un ou plusieurs mécanismes de déméthylation active de l'ADN. Chez les plantes, des enzymes à activité glycosylase capables de reconnaître les 5-mC initient une réparation de l'ADN méthylé par excision de base (BER ou *base excision repair*), cependant, aucune des enzymes impliquées ne semble avoir d'homologue chez les mammifères (Gehring *et al.*, 2009). Les voies de déméthylation actives de l'ADN ne sont apparemment pas aussi directes chez les mammifères mais il existe cependant des enzymes qui sont capables de reconnaître d'autres bases modifiées que les 5-mC et de les exciser par BER (figure 12).

La façon dont la méthylation de l'ADN intervient dans les changements de conformation de la chromatine repose principalement sur des mécanismes de recrutement/répulsion de protéines. Celles-ci peuvent être impliquées dans la modification des histones ou la régulation de la machinerie de transcription. De façon générale, la méthylation de l'ADN au niveau d'un promoteur est associée à une répression de la transcription, tandis qu'un gène actif est souvent méthylé au niveau de la séquence transcrite mais pas du promoteur (figure 13).

➤ **L'interaction entre les différentes modifications de la chromatine**

Toutes les modifications covalentes de la chromatine n'agissent pas seules, chacune de leur côté. Au contraire, elles interagissent entre elles, se provoquent ou se défont les unes les autres.

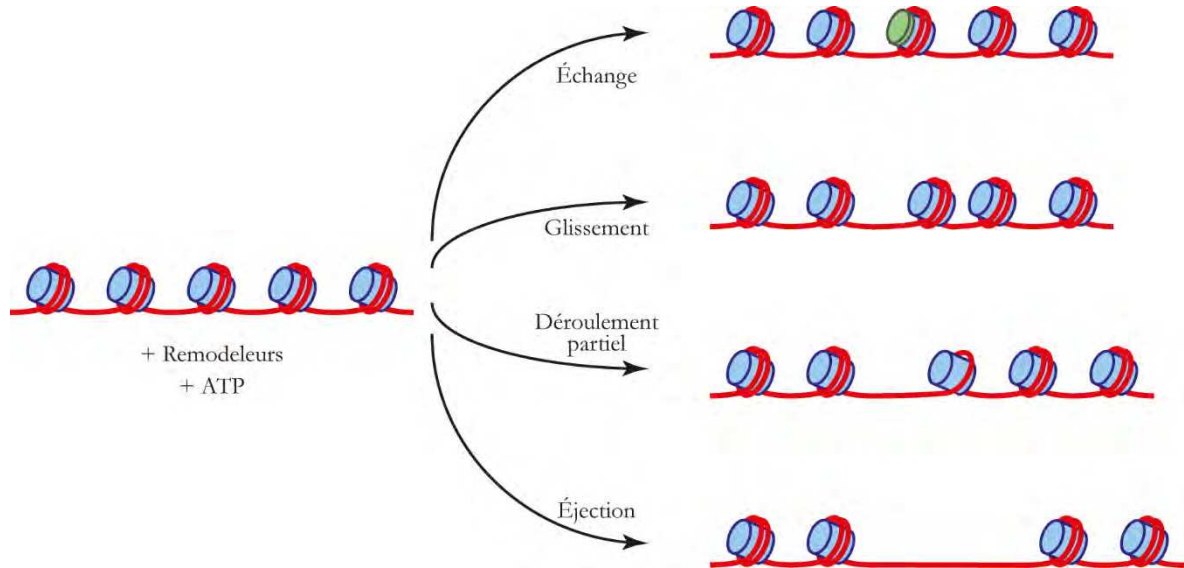


Figure 14 : Les différents types de remodelages de la chromatine

Les complexes de remodelage de la chromatine peuvent réaliser différentes actions sur les nucléosomes en fonction des protéines composant le complexe. Ces différentes activités sont cependant toutes consommatrices d'ATP.

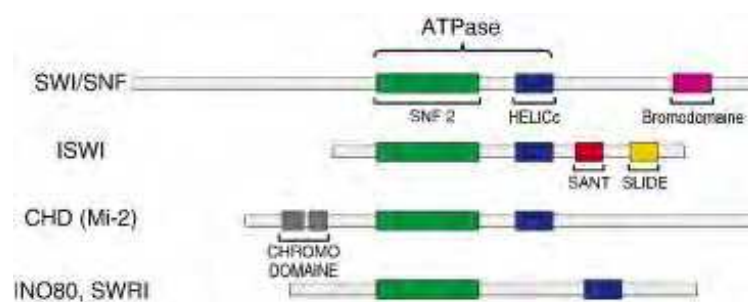


Figure 15 : Les familles des protéines de remodelage de la chromatine

Les différents domaines présents dans les sous-unités ATPases des complexes de remodelage de la chromatine déterminent la classe de ces complexes (Jerzmanowski, 2007).

Pour cela, elles recrutent différentes enzymes capables de réaliser des modifications covalentes ou de les enlever. Toutes ces modifications, en coopération ou en opposition, permettent le remodelage de la chromatine de façon à assurer une fonction biologique au sein de la cellule.

Par exemple, il existe un lien entre la méthylation de l'ADN et la modification des histones. Comme nous l'avons vu précédemment, les régions transcriptionnellement actives présentent des histones H3K4 méthylées. Or, ces histones modifiées inhibent la fixation de Dnmt3L à la chromatine, empêchant ainsi la méthylation *de novo* des gènes actifs par Dnmt3a et Dnmt3b. Ces séquences restent alors hypométhylées. Ceci est donc un exemple d'opposition entre deux modifications de la chromatine.

Cependant, les histones modifiées peuvent aussi agir conjointement avec la méthylation de l'ADN. C'est le cas lors de la réplication de l'hétérochromatine péricentromérique, précédant la mitose. Quel que soit le chromosome, cette région génomique contient un nombre important de séquences répétées comme les rétrotransposons, qui sont susceptibles de se multiplier et de s'insérer n'importe où dans l'ADN. Pour s'assurer du maintien de l'intégrité du génome, les régions péricentromériques sont maintenues dans une conformation très compacte par la présence de H3K9me, d'ADN méthylé et d'histones acétylées. H3K9me recrute la protéine UHRF1 (*ubiquitin-like PHD [Plant Homeodomain] and RING finger domain-containing protein 1* ; aussi appelée Np95 chez la souris et ICBP90 chez l'homme). Cette protéine peut effectuer la double reconnaissance de H3K9me et de l'ADN hémi-méthylé, dû à la néo-synthèse d'ADN. Elle va à son tour recruter HDAC1 de façon à désacétyler les histones nouvellement mises en place au cours de la réplication (Unoki *et al.*, 2004). Dans le même temps, UHRF1 recrute Dnmt1 qui va reproduire la méthylation des cytosines sur le brin néo-synthétisé afin de conserver le profil de méthylation de l'ADN. Ainsi, les modifications associées à l'hétérochromatine coopèrent tout au long de la réplication de façon à ce qu'elles soient reproduites à l'identique dans les deux cellules-filles obtenues en fin de mitose et que l'hétérochromatine péricentromérique garde sa structure très compacte et répressive.

Il faut aussi noter que les modifications des histones peuvent interagir entre elles. Les coopérations et les oppositions entre les différentes modifications des histones apportent une notion de « code des histones » où chaque modification seule ou en association avec d'autres aurait un sens défini du point de vue des mécanismes cellulaires occasionnés.

Ainsi, une exclusion mutuelle entre différents types de modification sur un même résidu peut être observée. Prenons pour exemple l'histone H3. La lysine (K) 9 de H3 peut être soit acétylée, soit méthylée. En termes de fonctions cellulaires, H3K9ac est associée aux promoteurs et à la partie 5' des gènes activement transcrits, tandis que H3K9me est associée à l'hétérochromatine qui est transcriptionnellement réprimée. La lysine 36 peut subir les mêmes modifications : H3K36ac est retrouvée dans les promoteurs des gènes activement transcrits et H3K36me dans la partie transcrite de ces mêmes gènes.

Nous avons déjà abordé auparavant un exemple d'interaction entre modifications de résidus différents sur une même histone : la phosphorylation du variant H2A.X. En effet, il est constitutivement phosphorylé sur la tyrosine Y142, puis phosphorylé sur la sérine S129 et déphosphorylé sur Y142 (forme γ -H2A.X) en cas de DSB. Les deux types de phosphorylation ne peuvent pas coexister sur une même protéine. D'un point de vue fonctionnel, en plus de maintenir

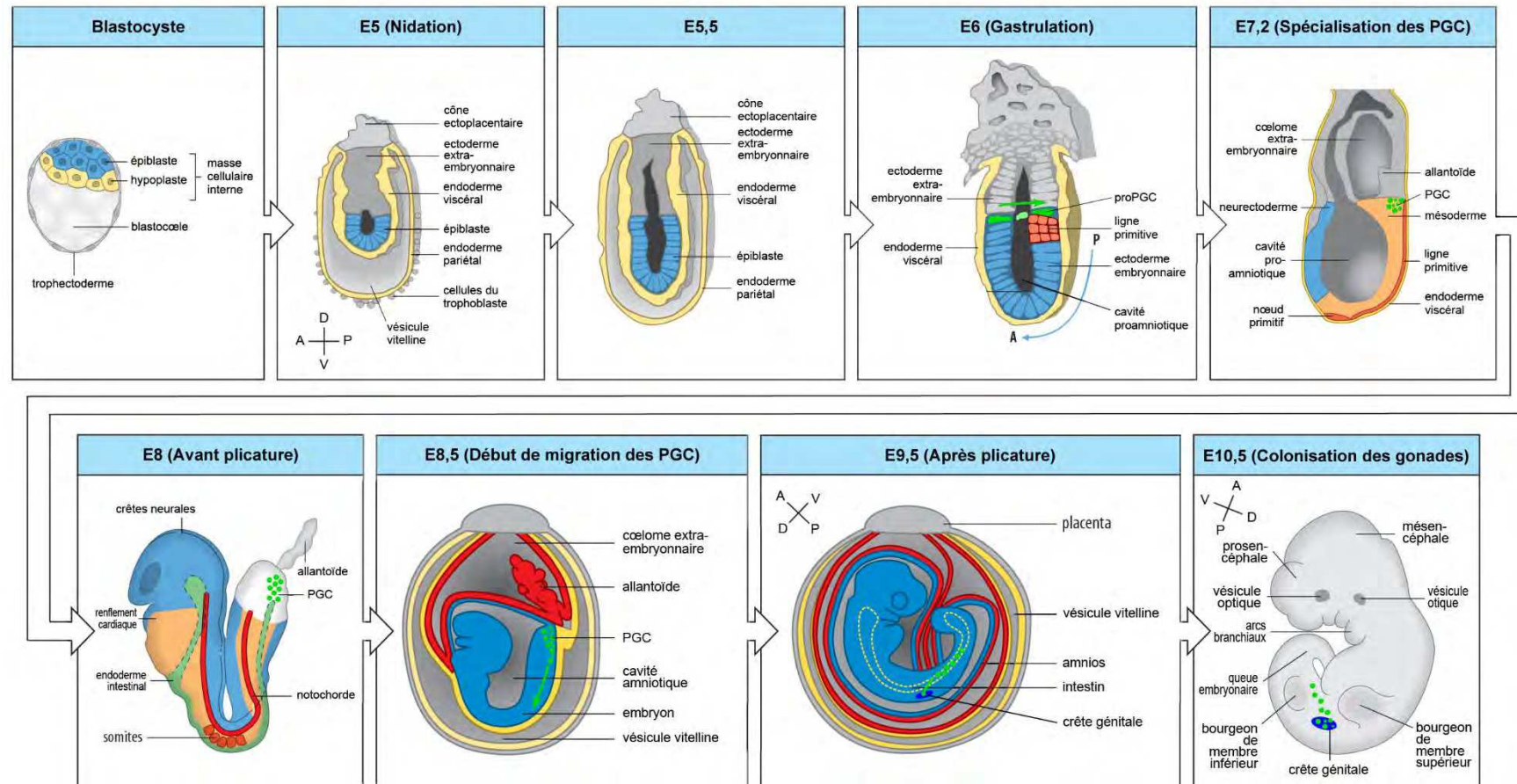


Figure 16 : La migration des cellules germinales primordiales chez la souris

L'axe antéro-postérieur (A-P) et l'axe dorso-ventral (D-V) sont indiqués. PGC : cellules germinales primordiales (Staveley, 2013).

les protéines de réparation en complexes autour du DSB durant la réparation de l'ADN, ce variant modifié serait à l'origine du recrutement d'un complexe d'histone acétyl transférase, permettant l'acétylation de H4. Il interagirait aussi avec INO80/SWR1, un complexe protéique dépendant de l'adénosine triphosphate (ATP), capable de remodeler la chromatine. L'acétylation des histones et ce complexe de remodelage agiraient en synergie pour permettre l'ouverture de la chromatine et faciliter le travail des enzymes de réparation de l'ADN (Downs *et al.*, 2004).

➤ **Les complexes de remodelage**

A travers certains de ces exemples d'interactions entre modifications de la chromatine, nous avons pu constater le rôle important de celles-ci dans le recrutement de différentes protéines. Certaines, que nous venons de voir, sont des protéines modifiant post-traductionnellement les histones et leurs variants, tandis que d'autres sont associées en complexes dits « de remodelage ». Ces derniers sont capables de reconnaître spécifiquement les différentes modifications des histones et de l'ADN puis d'agir sur les nucléosomes. Ils peuvent, selon leurs fonctions, les déplacer par glissement sur l'ADN, dérouler en partie l'ADN autour du nucléosome, remplacer certaines histones par des variants ou retirer complètement la particule de cœur du nucléosome (figure 14). Ils sont impliqués dans les mécanismes de réplication, de transcription, de réparation de l'ADN et d'assemblage de la chromatine.

Ces complexes sont dépendants de l'ATP et possèdent une sous-unité comportant un domaine ATPase/hélicase. Leurs fonctions varient selon les domaines portés par les membres du complexe et c'est en fonction des domaines portés par la sous-unité ATPase que ces complexes sont classés en 4 familles : les SWI/SNF (***S**witching and **S**ucrose **N**on-**F**ermenting*), les ISWI (***I**mitation **S**witch*), les INO80/SWR1 (***i**nositol biosynthesis/**S**WI/**S**NF-related protein*) et les CHD (***C**hromodomain*) (figure 15). Le nombre de sous-unités différentes qui les composent est variable (de 2 à plus de 10), de même que leur taille qui peut atteindre 1,5 MDa.

2. Les réarrangements chromatinien des cellules germinales

Toutes ces modifications de la chromatine que nous venons de passer en revue sont fondamentales lors de la différenciation des gamètes mâles : les spermatozoïdes. En effet, ces cellules possèdent un noyau particulier, dans lequel la chromatine n'est pas organisée comme celle des cellules somatiques. Le génome des spermatozoïdes est haploïde, plus compacté grâce au remplacement des histones par d'autres protéines basiques et avec une conformation spatiale de la chromatine très différente. Les réarrangements de la chromatine des spermatozoïdes commencent dès le stade embryonnaire, au sein des cellules progénitrices des futurs gamètes mâles, à partir du moment où elles commencent à subir une détermination sexuelle en fonction de leur génotype.

a. La formation des cellules germinales primordiales

Lors des tous premiers stades embryonnaires et jusqu'à la sixième semaine de développement chez l'homme (entre parenthèses : chez la souris ; 12 *days post-coitum* ou *dpc*), les cellules progénitrices des gamètes sont appelées les cellules germinales primordiales (PGC ou *primordial germ cells*). Au stade de la pré-gastrulation, l'embryon est formé de deux feuillet cellulaires, séparant deux cavités : l'épiblaste tourné vers la cavité amniotique et l'hypoblaste vers la vésicule

Méthylation de l'ADN

PGC

Prolifération & migration

Naissance

Puberté

Fécondation

Implantation

Embryon

DMR des gènes à empreinte parentale

Mâle

Femelle

Prospermatogonie

Croissance ovocytaire

PGC

Ovocyte primaire

VG

MI

Zygote

2 cellules

4 cellules

8 cellules

16 cellules

Blastocyste

M int

TE

E7.25

E12.5

Arrêt mitotique

Prolifération

Méiose

Méiose I

Arrêt méiotique

vitelline. Ce sont certaines cellules de l'épiblaste qui vont acquérir les caractéristiques des PGC (figure 16). Cette différenciation, principalement étudiée chez la souris, est réalisée à partir de 6 *dpc* sous l'action de facteurs *bone morphogenic proteins* (Bmp) produits par les cellules extra-embryonnaires bordant la cavité pro-amniotique. Sous l'action des facteurs de transcription *B lymphocyte-induced maturation protein 1* (Blimp1) et *PR domain-containing protein 14* (Prdm14) induits par les Bmp, ces cellules interrompent le programme transcriptionnel caractérisant les cellules somatiques (Hoxa1, Hoxb1, Fgf8...) et réacquièrent l'expression de certains facteurs de pluripotence (Sox2, Oct4, Nanog...). Chez l'homme, durant la troisième semaine (dès 6,5 *dpc*), ces cellules migrent vers la base de la future allantoïde. Entre 22 et 24 jours après la fécondation (7,25 *dpc*), au cours de la gastrulation, le lignage des PGC est définitivement acquis. Chez la souris, ces cellules sont environ une quarantaine. Entre la quatrième et la sixième semaines (entre 8,5 et 12,5 *dpc*), les PGC migrent à nouveau. Elles vont cette fois en direction des crêtes génitales, les futures gonades, qui sont mises en place durant la cinquième semaine (9,5-10 *dpc*). Cette migration est à la fois passive, sous l'action des plicatures cranio-caudales et latérales de l'embryon, et active, dirigée par des gradients de signaux chimiotactiques (*cytokine Kit-ligand*, *somatic chemokine stromal-derived factor 1*). Durant cette migration, les PGC prolifèrent de façon importante avec, chez la souris, un doublement de population toutes les 16 heures, pour atteindre environ 26 000 cellules à 13,5 *dpc* (Ewen & Koopman, 2010).

Lorsque les PGC rejoignent les crêtes génitales et prennent place dans les futures gonades, à partir de 10,5 *dpc*, leur environnement produit différents facteurs initiant la différenciation en cellules germinales ou gonocytes. Ces gonocytes arrêtent alors toute mitose. Alors que les PGC se comportent toujours de la même façon quelque soit leur génotype sexuel, les gonocytes vont évoluer différemment selon le phénotype sexuel de leur environnement somatique. Sous l'action d'un ou plusieurs facteurs produits par les futurs ovaires, dont probablement l'acide rétinoïque, les gonocytes XX entrent en méiose entre 12,5 et 15,5 *dpc* chez la souris, avant de s'arrêter au stade diplotène de la prophase I de méiose entre 17,5 *dpc* et 5 *days post-partum* (*dpp*). L'acide rétinoïque activerait la transcription de *Stra8* (*stimulated by retinoic acid gene 8 protein*) qui est requis pour la réplication de l'ADN et l'entrée en méiose. Chez les souris mâles, de 12,5 à 14,5 *dpc*, les gonocytes XY arrêtent tout processus mitotique. Les gonocytes sont alors considérés comme des pro-spermatogonies. Les futurs testicules semblent produire les mêmes facteurs pro-méiotiques que les futurs ovaires mais également un ou plusieurs facteurs inhibiteurs de ceux-ci. *Cyp26b1* (*cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1*), qui peut dégrader l'acide rétinoïque, et *Nanos2*, qui inhibe la transcription du gène codant pour *Stra8*, sont tous les deux de bons candidats en tant qu'inhibiteurs de la méiose (Ewen & Koopman, 2010).

b. La mise en place de l'empreinte parentale dans les cellules germinales primordiales

Dans le même temps, les PGC subissent une importante modification de la chromatine. Jusqu'à 10,5 *dpc*, leur génome est méthylé sur de nombreux *loci* dont des éléments transposables, le second chromosome X, inactivé dans les PGC de génotype XX, et les *loci* soumis à l'empreinte parentale. Cette empreinte parentale est un phénomène de différenciation de l'origine parentale des deux allèles d'un même gène, qui permet d'établir une expression transcriptionnelle mono-allélique dépendante de cette origine. Ces gènes sont souvent organisés en *cluster*, soit un ensemble de gènes, dont la transcription est soumise à l'état de méthylation d'une, voire deux régions différenciellement

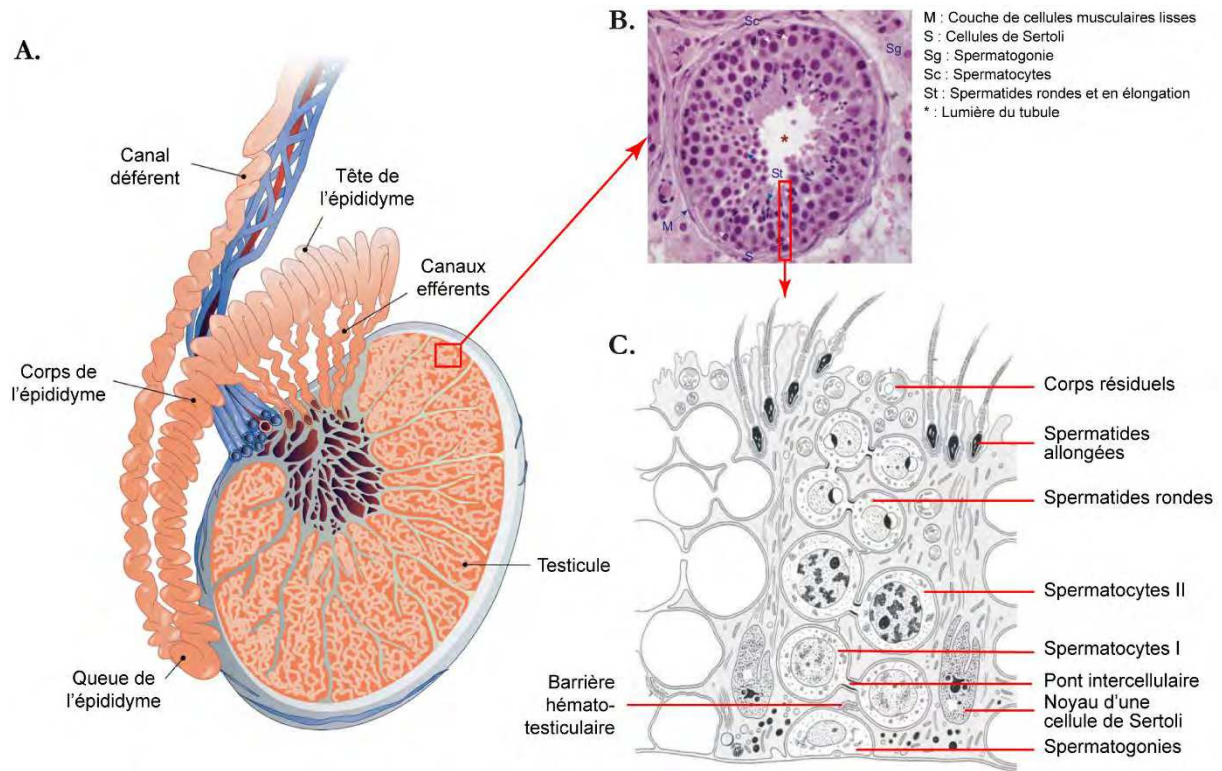


Figure 19 : Le testicule et les tubules séminifères, lieux de la spermatogenèse

- Schéma d'un testicule relié au canal déférent par l'intermédiaire de l'épididyme (Belleannée *et al.*, 2012)
- Coupe histologique transversale de testicule humain montrant un tubule séminifère (Clermont *et al.*, 2009).
- Schéma de la paroi d'un tubule séminifère présentant 2 cellules de Sertoli en contact avec des cellules germinales aux principaux stades de différenciation de la spermatogenèse (Holstein, 1994). Les cellules de Sertoli sont liées entre-elles par des jonctions serrées qui vont former la barrière hémato-testiculaire et délimiter deux compartiments — basal et adluminal. Ceci permet un contrôle permanent du milieu dans lequel baignent les cellules germinales. Elles forment des invaginations dans lesquelles se situent les futurs gamètes et les modifications de leur cytosquelette vont induire le mouvement des cellules germinales de la base de l'épithélium vers la lumière du tubule. Elles éliminent également au fur et à mesure les cellules germinales apoptotiques et les corps résiduels — vésicules membranaires contenant les organites et le cytosol excédentaires des spermatides — produits lors de la spermatogénèse et qui pourraient se révéler nuisibles pour la production des gamètes.

méthylées (DMR ou *differentially-methylated region*) selon leur origine parentale (figure 17). Cette méthylation est à l'origine du recrutement ou de la répulsion de différents facteurs modifiant les histones ou isolant les gènes de régions régulatrices. Dans un même *cluster* soumis à empreinte, certains gènes peuvent être maternellement exprimés tandis que les gènes voisins seront paternellement exprimés. Les DMR maternellement méthylées sont généralement situées dans une région promotrice ou intronique et concernent la quasi-totalité des *loci* soumis à empreinte parentale. Les DMR paternellement méthylées sont, elles, retrouvées dans des régions intergéniques et on ne compte pour l'instant que quatre *loci* avec une DMR paternellement méthylée (Igf2/H19 ; Rasgfr1 ; Dlk1/Gtl2 ou IG ; Zdbf2 (Kobayashi *et al.*, 2009)) pour plus d'une centaine de *loci* à empreinte connus.

Après la fécondation, alors que les génomes d'origine maternelle et paternelle sont presque entièrement déméthylés pour que les cellules embryonnaires deviennent totipotentes, les DMR conservent leur empreinte parentale. L'ADN des cellules embryonnaires est ensuite méthylé *de novo* par les Dnmt3 pour qu'elles puissent acquérir leur lignage spécifique. Cependant, les futurs gamètes devant tous présenter le même profil de méthylation sur ces *loci* particuliers, l'empreinte parentale doit finalement être effacée dans les PGC avant la méiose. Ce phénomène de déméthylation se produit justement quand les PGC atteignent et colonisent les crêtes génitales, entre 10,5 et 12,5 *dpc* chez la souris (figure 18). Cette déméthylation ne concerne pas uniquement les DMR, mais aussi certains éléments transposables et le second chromosome X des PGC de génotype XX qui est donc réactivé. Toutefois, les éléments transposables sont malgré tout conservés sous contrôle en ne les déméthylant que partiellement (La Salle & Trasler, 2006). Par ailleurs, les histones sont également impliquées dans ce phénomène d'effacement de l'empreinte parentale avec une perte de l'histone de liaison H1 et la déméthylation de H2AR3me et H4R3me, qui favorisent une décondensation de l'ADN (Ewen & Koopman, 2010).

L'acquisition de la nouvelle empreinte parentale ne se produit pas au même moment selon le génotype sexuel des gonocytes (figure 18). Chez la femelle, la méthylation *de novo* de l'ADN sur les *loci* maternellement méthylés ne se produit que lors de la maturation individuelle de chaque ovocyte, c'est-à-dire après la puberté, cycle après cycle, jusqu'à la ménopause. Chez la souris mâle, ce processus débute entre 15,5 et 18,5 *dpc* et se poursuit après la naissance jusqu'au stade pachytène de la méiose sous l'action des Dnmt3, lors de la spermatogenèse (La Salle & Trasler, 2006). Certaines séquences génomiques sont méthylées plus rapidement que d'autres, comme, par exemple, les séquences répétées et l'allèle hérité du père pour le *loci* paternellement méthylé de H19 (Davis *et al.*, 2000).

c. L'évolution de la chromatine lors de la spermatogenèse

Chez les mammifères mâles, les pro-spermatogonies fœtales en quiescence ne reprennent les divisions cellulaires qu'après la naissance. Avant la puberté, le taux de ces divisions reste inférieur à celui des cellules de Sertoli, conduisant à une augmentation du diamètre et de la longueur des cordons séminifères. C'est seulement au moment de la puberté que les divisions s'accroissent et que les testicules subissent un profond remodelage, sous l'action des hormones produites par l'axe hypothalamo-hypophysaire (GnRH, *gonadotropin releasing hormone* ; LH, *luteinizing hormone* ; FSH, *follicle stimulating hormone*). En effet, les cordons se creusent d'une lumière, devenant des tubules séminifères. Après que les pro-spermatogonies aient migrées près de la membrane basale des

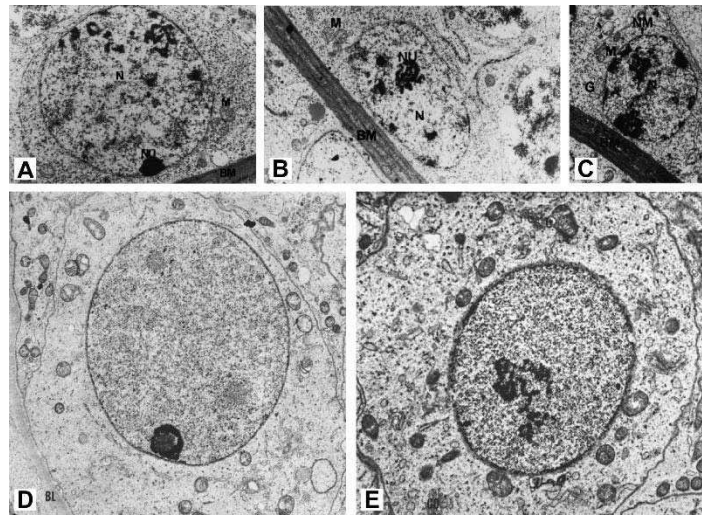


Figure 20 : Ultrastructure de la chromatine des spermatogonies au cours de leur différenciation

Observation par microscopie électronique à transmission de spermatogonies murines (A-C ; Martins & Silva, 2001) et humaines (D, E ; Rowley *et al.*, 1971). Les spermatogonies A (A, D) et intermédiaires (B) présentent moins d'hétérochromatine que les spermatogonies B (C, E). Les micrographies pour une même espèce sont à la même échelle.

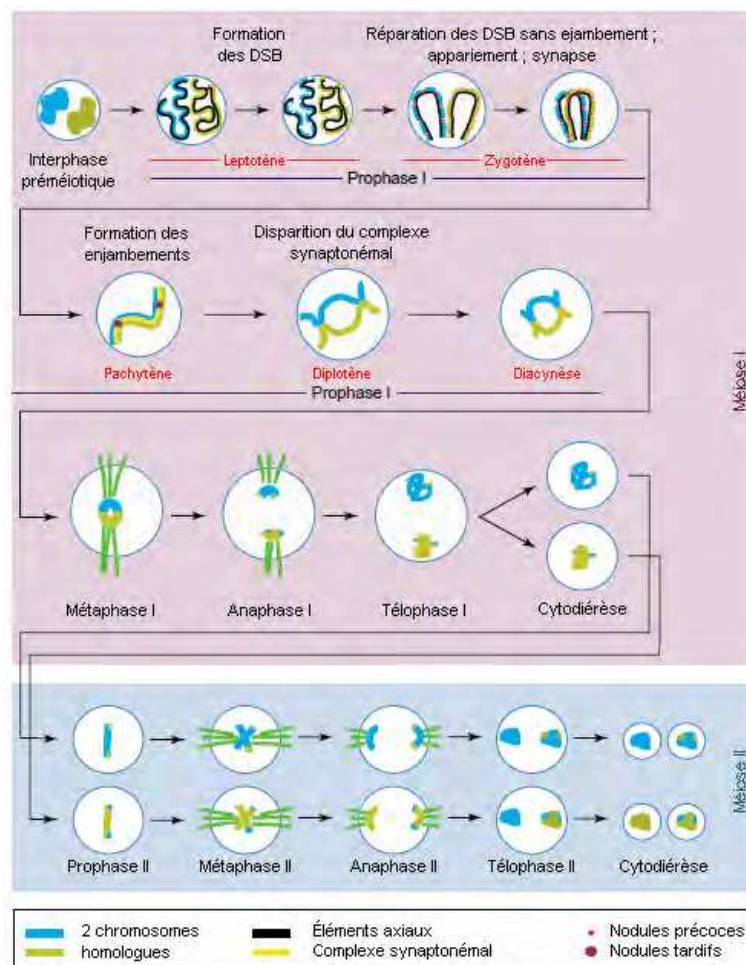


Figure 21 : Les phases de la méiose

Schématisation des phases I et II de la méiose où deux chromosomes homologues sont représentés, l'un en vert et l'autre en bleu (Pawlowski & Cande, 2005).

tubules, l'épithélium de ces derniers établit une barrière hémato-testiculaire fonctionnelle, par la mise en place de jonctions serrées entre les cellules. La production de gamètes mâles différenciés, appelée spermatogenèse, peut alors commencer. À ce stade, les pro-spermatogonies sont considérées comme des spermatogonies.

La spermatogenèse se déroule au sein de l'épithélium des tubules séminifères des testicules (figure 19). Cet épithélium est composé des cellules de Sertoli et des cellules germinales. Il est entouré d'une membrane basale et d'une couche de cellules péritubulaires myoïdes. Entre les tubules se trouve du tissu interstitiel riche en vaisseaux sanguins et lymphatiques et composé de cellules conjonctives, de leucocytes et de cellules de Leydig. Les deux extrémités des tubules séminifères se rejoignent puis se prolongent par le *rete testis* et les canaux efférents, dans lesquels seront transportés les spermatozoïdes après leur production. Mais avant de parvenir à ces canaux, les futurs gamètes vont devoir subir les trois grandes étapes qui composent la spermatogenèse : une phase pré-méiotique de prolifération des cellules souches germinales, une phase méiotique de production de cellules haploïdes et une phase post-méiotique de différenciation de celles-ci en spermatozoïdes.

➤ *La phase pré-méiotique*

Étant donné le nombre important de spermatozoïdes qui doivent être produits tous les jours jusqu'à la mort de l'individu (environ 100 millions/jours chez les mammifères), il est indispensable de renouveler en permanence la réserve des cellules germinales indifférenciées au fur et à mesure de l'entrée en différenciation des spermatogonies. Certaines spermatogonies possèdent donc la capacité de s'auto-renouveler en permanence : elles sont de type A. De façon cyclique et sous l'influence de différents facteurs, ces cellules produisent des spermatogonies de type B qui n'ont pas cette capacité et qui commencent un processus de différenciation. Ce cycle est de 8,65 jours chez la souris et de 16 jours chez l'homme. Il faut noter que chez les rongeurs et les primates non-humains il existe d'autres types cellulaires intermédiaires entre les types A et B.

Les spermatogonies, au fur et à mesure de leur différenciation, vont subir certaines modifications de la chromatine. En effet, une des principales caractéristiques qui permettent de différencier les cellules de type A et B est la présence (B) ou non (A) d'hétérochromatine dans leur noyau lors d'une observation en microscopie électronique (figure 20). En effet, plus la différenciation se poursuit, plus les gènes impliqués dans l'auto-renouvellement sont inactivés par la formation d'hétérochromatine.

➤ *La méiose*

Les spermatogonies sont des cellules diploïdes. Lors de la spermatogenèse, elles vont subir le processus de la méiose qui, par deux divisions successives (I et II), va produire quatre cellules haploïdes : les spermatides. Cette méiose est subdivisée en différentes phases proches de celles observées pendant la mitose (figure 21). Cependant, la durée et le déroulement de ces étapes peuvent parfois être très différents.

• *La phase pré-leptotène*

Les spermatogonies de type B, se préparant à entrer en méiose, répliquent leur ADN et présentent une forte activité transcriptionnelle de certains gènes et donc une augmentation de

l'acétylation de histones H2A, H2B et H4 dans ces régions, pour faciliter l'ouverture de la chromatine. L'acétylation des histones se propage au fur et à mesure de la réplication du génome pour ouvrir la chromatine et faciliter le travail de la machinerie de réplication. Les cellules en réplication sont au stade pré-leptotène de la première division de la méiose, ce ne sont donc plus des spermatogonies mais des spermatocytes. C'est à ce stade que des remplacements d'histones canoniques par des variants vont commencer à se produire. Cela commence par l'incorporation de TH2B, un variant de H2B spécifique du testicule, qui semble promouvoir une plus grande instabilité des nucléosomes qui le contiennent (Li *et al.*, 2005 ; Singleton *et al.*, 2007). À la fin de la réplication, les chromosomes sont tous dédoublés : ils possèdent deux chromatides sœurs reliées par des protéines : le complexe cohésine. Puis les spermatocytes, poussés par les cellules de Sertoli, traversent la barrière hémato-testiculaire qui se referme derrière eux. Ils peuvent à partir de maintenant exprimer des protéines de surfaces spécifiques des spermatozoïdes sans risque d'être éliminés par le système immunitaire.

- La prophase I

Les cellules vont ensuite appairer leurs chromosomes homologues et réaliser des échanges d'information génétique entre ceux-ci durant la longue période de la prophase I. Elle est divisée en cinq étapes en fonction de l'état caractéristique de la chromatine et des événements génétiques : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse.

La phase leptotène

Une fois leur ADN répliqué, les spermatocytes entrent dans le stade leptotène de la prophase I. Durant cette étape, la chromatine commence à se condenser. Les télomères s'associent à la membrane nucléaire pour initier un rapprochement spatial des chromosomes homologues et les chromatides subissent de nombreuses cassures doubles brins (DSB) qui vont permettre la reconnaissance entre les chromosomes homologues et stabiliser leur association. Enfin, une structure protéique fibrillaire s'accumule tout le long des chromatides sœurs assemblées pour former l'élément axial. La compaction de la chromatine est assurée par une désacétylation et une méthylation des histones. La triméthylation de H3K9 est réalisée par les Suv39h1 et Suv39h2 (*suppressor of variegation 3-9 homolog*), des KMT, en particulier au niveau des régions péricentromériques, pour éviter la formation d'un appariement non homologue de deux chromosomes par la formation de *crossing-over* ou enjambements trop proches des centromères. De plus, les modifications H3K9me1/2 et H3K4me3 semblent essentielles pour le bon déroulement de l'appariement des chromosomes. Le mécanisme peut être lié à la régulation des gènes impliqués dans la méiose ou/et à la conformation de la chromatine pouvant diriger la formation des DSB (cf. revue Sasaki & Matsui, 2008). Les cassures de l'ADN induisent dans leur périphérie la formation de la forme gamma de H2A.X, indispensable au bon déroulement de la réparation de l'ADN, et une hyperacétylation de H4, favorisant l'ouverture de la chromatine (Buard *et al.*, 2009).

La phase zygotène

Lorsque l'élément axial est disposé sur toute la longueur des chromosomes et que ceux-ci commencent à s'apparier entre homologues, les spermatocytes entrent dans l'étape zygotène. Durant cette période, les chromosomes homologues s'alignent et un complexe protéique dit synaptonémal se forme entre eux pour maintenir leur association en reliant les deux éléments

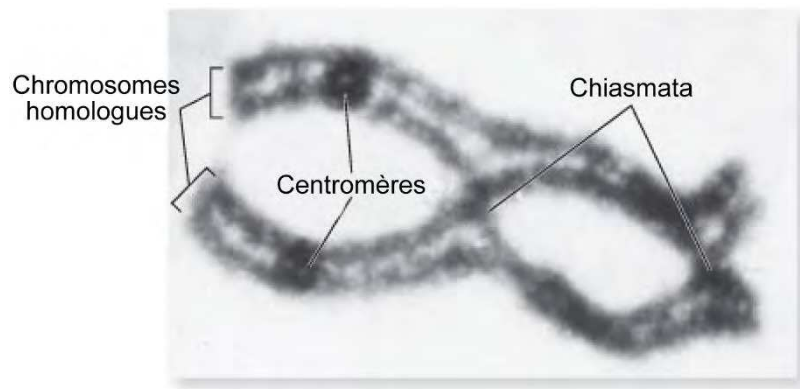


Figure 22 : Les *chiasmata*

Cette micrographie montre une paire de chromosomes homologues de salamandre s'échangeant une portion de leurs chromatides durant la prophase I de la méiose, au niveau de deux *chiasmata* (Sadava *et al.*, 2008).

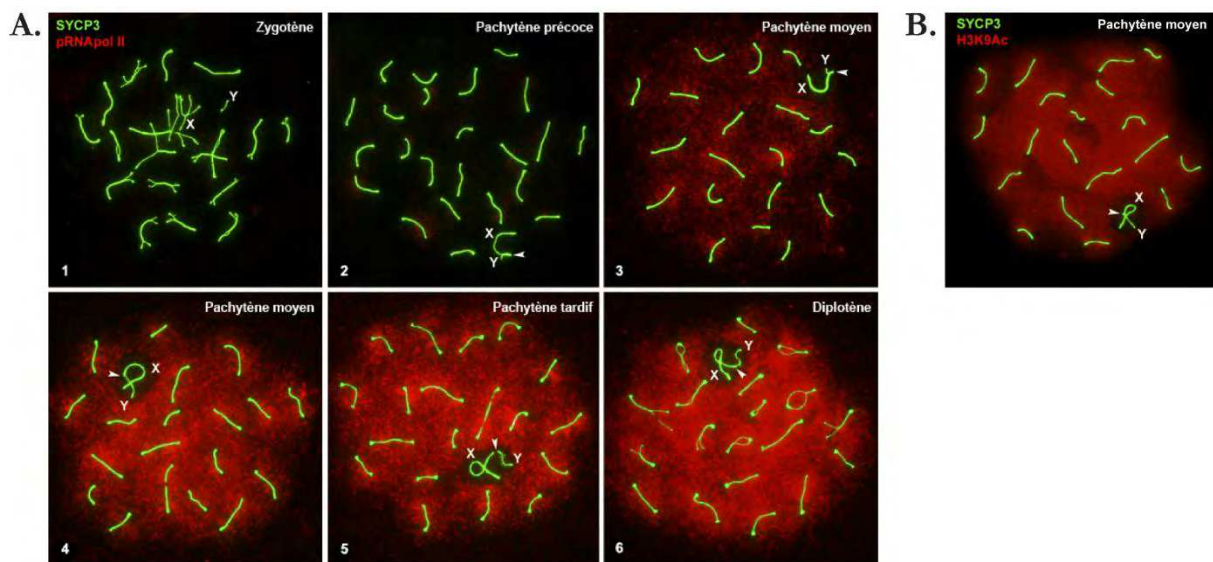


Figure 23 : L'activité de transcription durant la méiose

Lors de la phase pachytène de la méiose, la transcription des gènes reprend dans tout le génome à l'exception des chromosomes sexuels, comme le montrent ici le marquage de l'ARN polymérase II (A). Cette reprise de la transcription s'accompagne d'une modification d'un certain nombre de marques épigénétiques associées aux histones comme la mise en place de l'acétylation de H3 sur la lysine 9 (B), généralement associée à la chromatine transcriptionnellement active (Page *et al.*, 2012).

axiaux. Cette association étroite et stable entre les chromosomes homologues favorise la réparation des cassures doubles brins par des complexes protéiques. Durant la phase zygotène, une grande proportion de DSB va être réparée par synthèse complémentaire au brin homologue mais sans réalisation de *crossing-over* ou enjambement. Par ailleurs, la forte activité de réparation durant cette étape va considérablement réduire la quantité de γ -H2A.X présents sur les chromosomes.

La phase pachytène

La fin de la formation du complexe synaptonémal entre les autosomes homologues marque l'entrée dans la phase pachytène, qui est la plus longue de toute la méiose (environ 6 jours chez la souris et 2 semaines chez l'homme). C'est durant cette phase que des recombinaisons homologues vont se produire, ainsi que de nombreuses modifications de la chromatine dont la fin de la méthylation *de novo* de l'ADN, excepté pour quelques *loci*. Cependant, lors de cette phase, il est important de distinguer le devenir des autosomes de celui des chromosomes sexuels.

Les chromosomes sexuels des spermatocytes I ont un comportement spécifique. Lors du passage entre les stades zygotène et pachytène, leur courte partie pseudo-autosomale subie bien un processus de synapse entre les chromosomes X et Y mais leur chromatine est rapidement et fortement condensée et inactivée, formant un ensemble particulier visible en microscopie : le corps sexuel ou *sex (XY) body*. Ce mécanisme de formation d'hétérochromatine dans les chromosomes sexuels est basé sur la réalisation de nombreuses modifications des histones présentes sur ces chromosomes, ainsi que de l'incorporation du variant macroH2A (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003 ; Turner *et al.*, 2004).

La réparation des dernières cassures des autosomes associés par paire se poursuit en parallèle durant toute la phase pachytène, mais selon un mécanisme différent de celui utilisé lors de la phase zygotène. Ce processus de réparation a la particularité de conduire à la formation d'enjambements entre les chromatides homologues (figure 22). Les autosomes présentent alors de moins en moins de γ -H2A.X. Dans le même temps, des remplacements d'histones canoniques par des variants se produisent et ouvrent la chromatine pour permettre une transcription massive (figure 23A). Il semble que ces remplacements soient facilités par la propagation de l'ubiquitination de H2A dans le génome. H2A est ainsi remplacée par TH2A, dont le rôle n'est pas connu, et H2B l'est par TH2B qui possède des sites modifiables supplémentaires. Par ailleurs, dans les régions activement transcrites, les histones H3 enlevées par le complexe de transcription sont échangées contre leur variant H3.3, codé par deux gènes différents (A et B), et H3K9 est acétylée (figure 23B) (Page *et al.*, 2012). De plus, la moitié des H1 est remplacée par le variant H1t qui entraîne une moins forte compaction dans les régions concernées.

La phase diplotène

La fin des réparations de l'ADN marque l'entrée en stade diplotène. Celui-ci va consister à défaire le complexe synaptonémal qui lie étroitement les chromosomes homologues sur toute leur longueur, en finissant par le centromère. Les chromosomes ne seront alors maintenus ensemble qu'au niveau des enjambements réalisés lors du stade pachytène. Ces sites de liaison sont appelés des *chiasmata*.

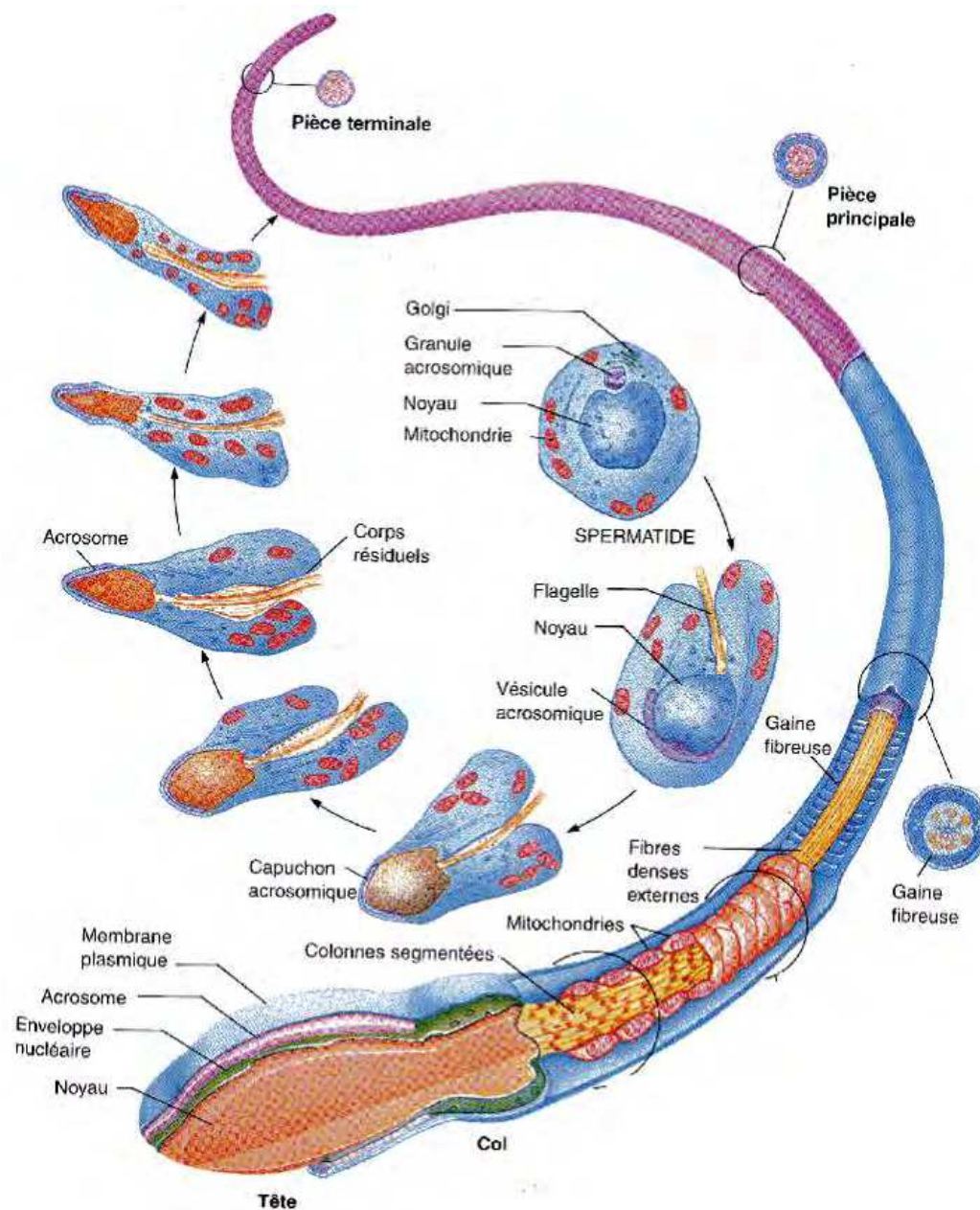


Figure 24 : Les remaniements morphologiques des gamètes lors de la spermiogenèse
Éditions Pradel, 1993.

La phase diacinèse

Par la suite, les spermatocytes I entre en diacinèse, qui est la fin de la prophase I. Durant cette phase, les télomères se séparent de la membrane nucléaire et la chromatine se condense très fortement. À la fin de la prophase I, la membrane nucléaire est éliminée et le fuseau méiotique commence à se former.

- La fin de la méiose I

Les spermatocytes s'engagent alors dans la métaphase I. Les paires de chromosomes s'alignent sur la plaque équatoriale, avec un homologue de chaque côté. Le fuseau méiotique finit de se mettre en place et s'accroche aux centromères de chaque chromatide des chromosomes grâce au kinétochore, entre autres par l'intermédiaire du variant de H3, Cenp-A. En anaphase I, la cohésion entre les chromatides sœurs est rompue, excepté au centromère, permettant des échanges de chromatides entre les chromosomes homologues. Pour chaque paire d'homologues, le fuseau méiotique tire ensuite un chromosome « chimérique » à chaque pôle de la cellule. Ainsi, la division I de méiose est dite « réductionnelle » car elle réduit de moitié le nombre de chromosomes dans les cellules-filles, qui sont alors haploïdes. Pour terminer cette première division, lors de la télophase I, le fuseau se désagrége et libère les deux groupes de chromosomes autour desquels se reforme ou non une enveloppe nucléaire selon les espèces, tandis que la membrane cytoplasmique s'invagine au niveau de la plaque équatoriale pour définir les deux cellules-filles (figure 21).

- La méiose II

Les spermatocytes entrent ensuite dans la deuxième division de méiose qui est « équationnelle ». Il n'y a aucune réplication de l'ADN entre les deux divisions : se sont maintenant les chromatides sœurs qui vont être séparées entre deux cellules-filles possédant le même nombre de chromosomes. L'enchaînement des phases de cette division est identique à celui d'une mitose (figure 21). Lors de la prophase II, l'enveloppe nucléaire est éliminée pendant que le centrosome se réplique et migre vers les pôles. En métaphase II, les chromosomes se positionnent sur la plaque équatoriale et se lient au fuseau mitotique en formation. En anaphase II, les complexes cohésines restant aux centromères sont dégradés et chaque chromatide sœur est tirée vers un pôle du spermatocyte II. Les deux ensembles de chromosomes s'entourent chacun d'une nouvelle membrane nucléaire lors de la télophase II. À nouveau, la cytodierèse sépare les cellules-filles. A ce stade, la méiose est terminée et les spermatocytes prennent le nom de spermatides.

➤ **La spermiogenèse**

À la fin de la méiose, les spermatides sont de petites cellules rondes qui ne ressemblent en rien à des spermatozoïdes. Elles vont donc subir de profondes modifications morphologiques et biochimiques pour acquérir les caractéristiques et surtout les fonctions de ceux-ci. Une grande partie de ces changements se produit lors de la phase post-méiotique de la spermatogenèse appelée spermiogenèse. Cette phase se déroule en différentes étapes, découpées en fonction de la formation des différentes structures (acrosome, flagelle, noyau) des spermatozoïdes, et dont le nombre varie d'une espèce à l'autre : 19 étapes chez le rat, 16 chez la souris et 8 chez l'homme.

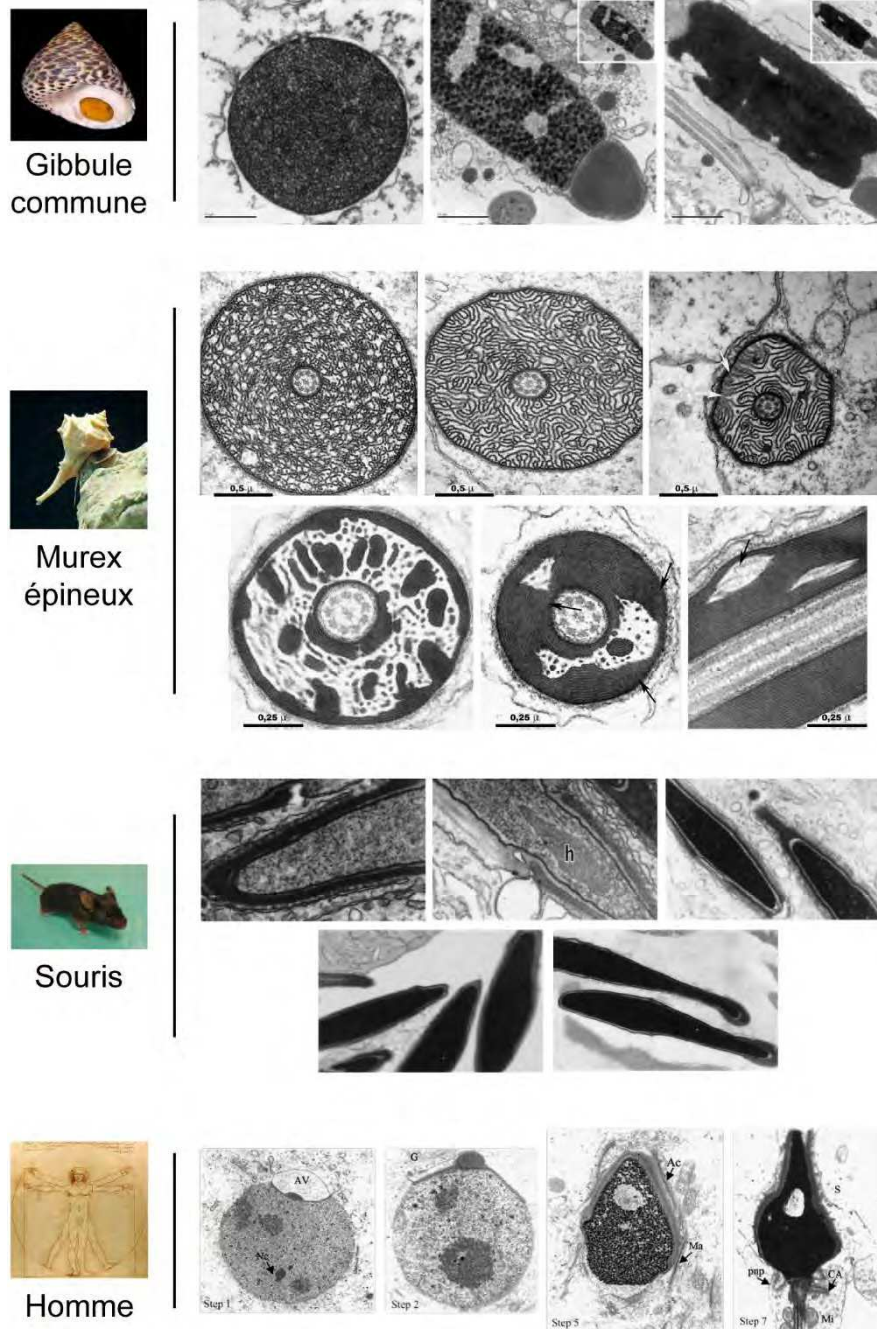


Figure 25 : L'évolution de la chromatine des spermatozoïdes en élongation

L'observation par microscopie électronique à transmission de l'évolution de la chromatine spermatique lors de la phase de spermiogenèse chez différentes espèces montre une grande variabilité du modèle de condensation de l'ADN (Zhao *et al.*, 2001 ; Dadoune *et al.*, 2004 ; Chiva *et al.*, 2011).

Cinq remaniements morphologiques importants se produisent simultanément lors de la spermiogenèse (figure 24) :

- La formation de l'acrosome, une vésicule recouvrant le pôle antérieur du noyau spermatique et dont le contenu très riche en enzymes protéolytiques permettra au spermatozoïde de perforer la zone pellucide entourant l'ovocyte au moment de la fécondation ;
- La formation du flagelle, qui assurera au spermatozoïde sa mobilité dans le tractus génital femelle ;
- L'alignement des mitochondries le long de la partie proximale du flagelle, qui produiront l'énergie nécessaire aux mouvements du flagelle ;
- L'élimination d'une grande partie du cytoplasme dont la plupart des organites ;
- La très forte condensation de l'ADN, qui permet de protéger le génome paternel des attaques chimiques extérieures, et le changement de forme du noyau qui s'allonge.

L'appareil de Golgi des spermatides rondes commence par produire des vésicules chargées d'enzymes qui vont fusionnées ensemble à côté du pôle antérieur du noyau pour former le granule acrosomique. Au fur et à mesure que celui-ci s'étend, les deux centrioles migrent au pôle opposé et se logent dans une dépression du noyau. A ce stade, la chromatine possède une structure similaire à celle observée dans une cellule somatique en interphase. Par la suite, dans les spermatides en condensation, la chromatine commence à se condenser, inhibant toute transcription. L'aspect de cette chromatine en condensation évolue de façon différente selon les espèces, suivant parfois des modifications complexes (figure 25) (Chiva *et al.*, 2011). Chez les mammifères, la condensation de la chromatine se propage de la périphérie vers le centre du noyau et du pôle antérieur vers le pôle postérieur. Le noyau s'allonge progressivement et le granule acrosomique grandit et épouse la forme du noyau qu'il recouvre peu à peu en s'affinant. Simultanément, le centriole le plus éloigné du noyau commence à former le flagelle. Durant l'allongement du flagelle, les mitochondries migrent pour en entourer la partie proximale, où elles s'organisent en spirale. Conjointement, le volume du cytoplasme se déplace avec les autres organites vers le pôle caudal de la spermatide où ils entourent la base du flagelle, la chromatine atteint une condensation maximale, le noyau prend son apparence finale qui peut varier selon les espèces et le granule acrosomique recouvre les 2/3 du noyau en prenant sa forme finale : l'acrosome. Les spermatides condensées vont ensuite subir la phase finale de la spermiogenèse : la spermiation. Celle-ci consiste à retirer l'excès de cytoplasme sous forme de corps résiduels qui seront phagocytés par les cellules de Sertoli et à libérer les spermatozoïdes dans la lumière du tubule séminifère (O'Donnell *et al.*, 2011).

La condensation de la chromatine des spermatides est due à un profond remaniement des protéines liées à l'ADN (figure 26). En effet, des modifications des histones et des incorporations de variants précèdent un échange de la quasi-totalité des histones, canoniques ou non, par des protéines de transition (Tnp). Elles-mêmes seront à leur tour remplacées par d'autres protéines : les protamines (Prm). Toutes ces modifications successives provoquent une réorganisation complète de la structure de la chromatine spermatique, permettant une condensation plus importante que celle observée dans les cellules somatiques.

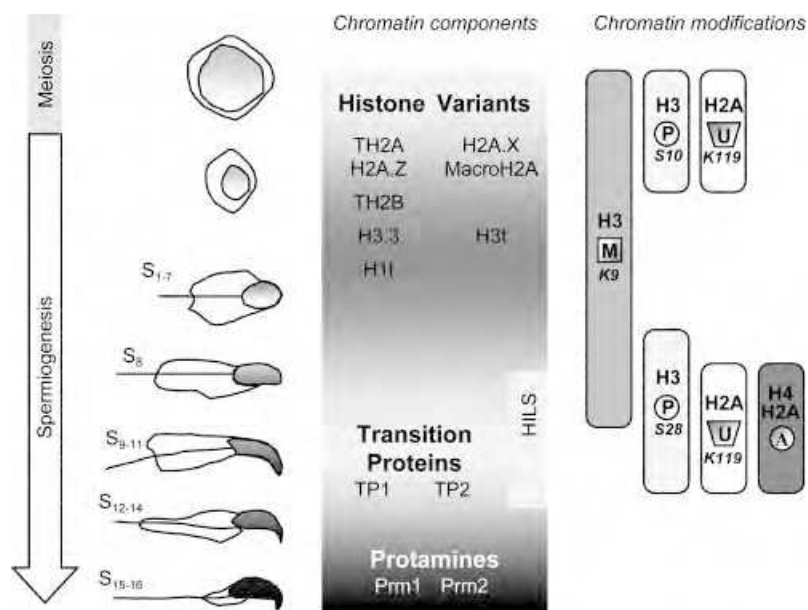


Figure 26 : Les modifications de la chromatine des spermatides durant la spermiogenèse

Lors de la spermiogenèse, les protéines associées à l'ADN subissent de nombreuses modifications dont des incorporations de variants d'histones, des modifications biochimiques d'histones canoniques et un remplacement par d'autres protéines nucléaires basiques, suivant une cinétique précise représentée ici (Govin *et al.*, 2004).

- Les modifications des histones

Les spermatides rondes sont transcriptionnellement actives et continuent à produire, entre autres, des variants d'histones qui seront incorporés dans le génome (Dadoune *et al.*, 2004). C'est le cas pour les variants de l'histone de liaison H1. Nous avons vu qu'une partie des H1 canoniques avaient été remplacées par le variant H1t, or celui-ci va à son tour être progressivement remplacé par deux autres variants : *H1 histone family, member N, testis-specific* (H1fnt/H1t2) et *histone H1-like protein in spermatids 1* (Hils). Le remplacement de H1t semble être lié à sa phosphorylation progressive (Sarg *et al.*, 2009). H1t2 commence à être incorporée dans les spermatides rondes de façon très localisée, dans la partie apicale sub-acrosomale du noyau. Cependant, Hils n'apparaît que dans les spermatides en élongation et semble impliquée dans la condensation du noyau.

Des modifications covalentes des histones canoniques sont également observées. Les deux plus notables sont l'hyperacétylation de H4 et l'ubiquitination de H2A et H3. Ces deux modifications sont mises en place simultanément et semblent toutes les deux participer au remplacement des histones par d'autres protéines nucléaires basiques.

L'ubiquitination des histones commence au début de l'élongation. Cette modification présentant un fort encombrement stérique semble participer à l'ouverture de la chromatine et ainsi favoriser le remplacement des histones. L'enzyme probablement impliquée dans l'ubiquitination est l'*ubiquitin-conjugating enzyme E2 B* (HR6B) (Roest *et al.*, 1996).

Simultanément au retrait de H1t et à l'ubiquitination, les HDAC qui maintenaient une hypoacétylation générale des histones depuis la prophase I de la méiose sont dégradées (Caron *et al.*, 2003) et une hyperacétylation de H4, parfois de H3, se produit dans tout le noyau. Le principal argument en faveur d'un rôle de l'hyperacétylation de H4 dans le remplacement des histones est que ce phénomène n'est observé que chez les espèces dont les histones sont éliminées des spermatides comme chez la truite, le coq, les mollusques (Kurtz *et al.*, 2009), la drosophile, les rongeurs et l'homme. Elle consiste en une phosphorylation de multiples résidus de H4 selon un ordre précis (homme) ou non (mollusques), qui précède et se superpose à l'échange des histones. Deux mécanismes d'action ont été proposés et ne sont pas exclusifs l'un de l'autre. D'une part, comme à d'autres moments de la vie cellulaire, l'hyperacétylation semble déstabiliser l'interaction entre l'ADN et les histones et ainsi permettre une ouverture de la chromatine pour faciliter la fixation de facteurs et les échanges de protéines. D'autre part, cette hyperacétylation permet le recrutement et la fixation de facteurs à bromodomaine, capables de reconnaître les lysines acétylées. Chez l'homme et les rongeurs, l'un de ces facteurs est Brdt (*bromodomain testis-specific protein*) qui possède deux bromodomaines et dont l'expression est restreinte aux cellules germinales durant les phases pachytène et diplotène des spermatocytes et dans les spermatides rondes et en élongation (Shang *et al.*, 2007 ; Dhar *et al.*, 2012). Brdt a la capacité d'induire une condensation de la chromatine lorsqu'il se lie à la forme hyperacétylée de H4 de façon indépendante de l'ATP ce qui suppose une action structurelle (Pivot-Pajot *et al.*, 2003 ; Dhar *et al.*, 2012). Cependant, lorsqu'il est fixé à H4ac, Brdt semble également capable de recruter une protéine appartenant à un complexe SWI/SNF de remodelage dépendant de l'ATP : Smarce1 (*SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin e1*) (Dhar *et al.*, 2012). Donc l'action de cette protéine à bromodomaines est peut-être double.

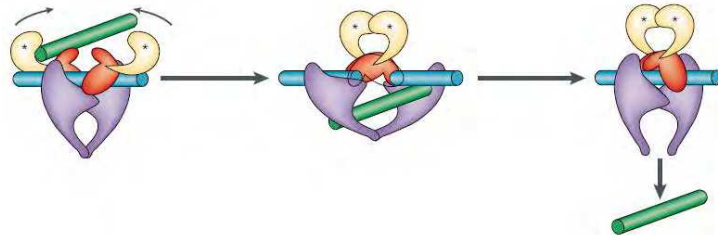


Figure 27 : Le fonctionnement de la topoisomérase

La topoisomérase II β fonctionne sous forme d'homodimère. La partie amino-terminale de chaque monomère est un domaine ATPase (astérisque) permettant l'activité de l'enzyme. La zone de liaison et de clivage de l'ADN (rouge) permet de réaliser une coupure double brin dans un filament d'ADN (bleu, G-segment) afin de faire passer un autre filament (vert, T-segment) à travers la coupure. Le brin d'ADN clivé est ensuite réparé, puis le filament ayant traversé est relâché par la pince formée par les parties carboxy-terminale (violet) de la topoisomérase II β (Wang, 2002).

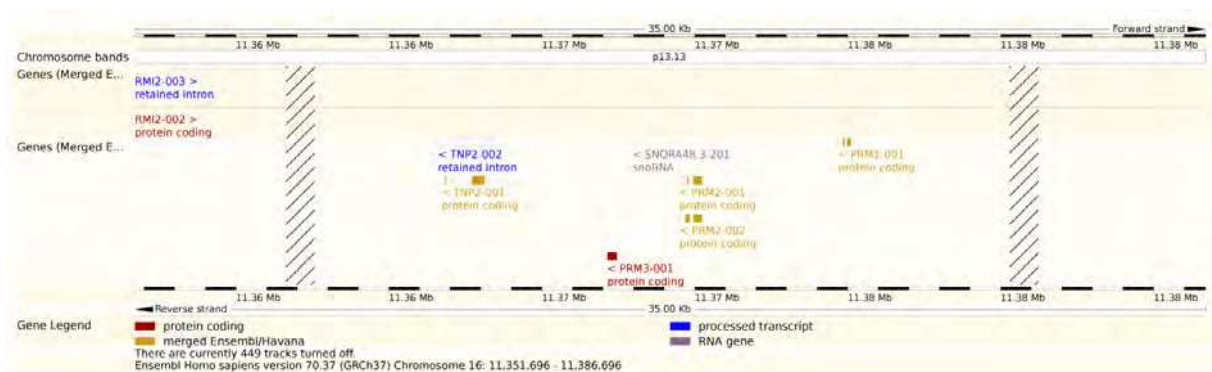


Figure 28 : Le locus *tnp2/prm*

L'organisation du locus comportant les gènes des protamines et de Tnp2 chez l'homme est indiquée d'après la base de données Ensembl. La position des MAR spermatiques qui encadrent ces gènes est représentée par des hachures (Martins *et al.*, 2004).

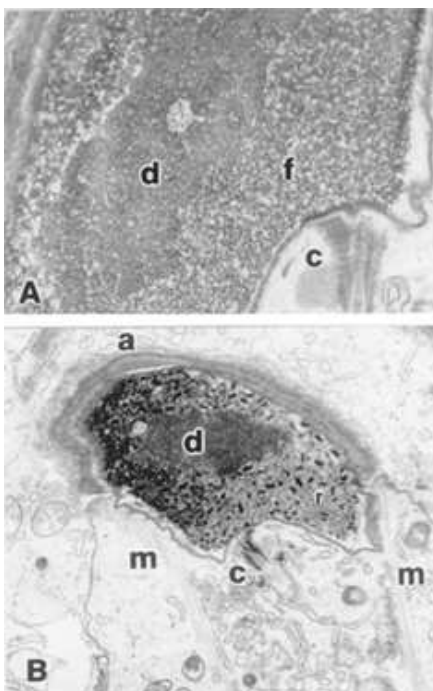
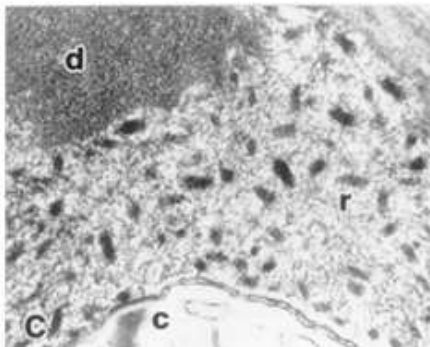


Figure 29 : La condensation de la chromatine des spermatides des souris *Tnp1*^{-/-}

La condensation de la chromatine au début de la phase d'élongation des spermatides est observée par microscopie électronique à transmission chez les souris sauvages (A ; x 324 500) et invalidées pour Tnp1 (B, x 37 800 ; C, x 339 000). c : centriole, a : acrosome, m : manchette, d : région centrale différentielle de condensation de la chromatine, f : chromatine fibrillaire, r : points focaux en forme de bâtonnets (Yu *et al.*, 2000).



Par ailleurs, le remplacement subséquent des histones par d'autres protéines réorganise complètement la structure de la chromatine auparavant basée sur des surenroulements successifs. Ainsi, il apparaît évident que le passage d'une structure à l'autre génère une torsion de l'ADN qui peut l'abîmer, ainsi que des nœuds entre les brins. Des enzymes de clivage simple ou double brin de l'ADN, les topoisomérases, sont chargées d'effectuer des cassures de manière contrôlée lors de différents événements nucléaires tels que la réplication, la transcription, la condensation ou la décondensation de la chromatine et la recombinaison de l'ADN (Wang, 2002) (figure 27). Dans le noyau des spermatides en élongation, entre 5 et 10 millions de cassures de l'ADN sont donc observées et la présence de γ H2A.X est importante puis diminue au fur et à mesure que les réparations se produisent durant la condensation de la chromatine selon sa nouvelle structure.

- Les protéines de transition

Chez les mammifères, les histones sont tout d'abord remplacées par des protéines de transition (Tnp). Cependant, toutes les espèces ne présentent pas de Tnp car la transition entre les histones et les Prm est parfois directe comme chez les mollusques (Chiva *et al.*, 2011). Ces petites protéines (entre 50 et 140 résidus) sont plus basiques que les histones mais moins que les protamines, grâce à leur composition riche en arginine et en lysine. Du point de vue de l'évolution, elles semblent dériver du même gène ancestral que H1. On en dénombre quatre, mais seules Tnp1 et Tnp2 ont été bien étudiées.

Les gènes qui les codent sont composés de deux exons et un intron. Chez les rongeurs et l'homme, le gène *tnp2* fait partie d'un cluster avec *prm1*, *prm2* et *prm3*, qui a la particularité d'être encadré de deux séquences S/MAR importantes pour la régulation de la transcription (figure 28) (Martins *et al.*, 2004). Les gènes du cluster et de *tnp1* sont transcrits au même moment, dans les spermatides rondes, bien avant que les protéines correspondantes soient nécessaires. Les ARNm sont donc conservés pendant 3 à 7 jours jusqu'à la traduction. Cette conservation est faite sous forme de ribonucléoprotéines, c'est-à-dire une association entre un ARNm et une ou plusieurs protéines. Les protéines impliquées reconnaissent des séquences dans la partie 3' UTR des ARNm. De plus, il semble que ces transcrits présentent une longue queue polyA d'environ 150 nucléotides qui est partiellement clivée — il reste environ 50 nucléotides — avant la traduction en protéines. Lorsque les Tnp sont traduites, elles sont phosphorylées au niveau de la partie carboxy-terminale. Cette phosphorylation est nécessaire au dépôt des Tnp sur l'ADN. Les protéines sont ensuite déphosphorylées, ce qui permet une plus grande affinité avec l'ADN et, ainsi, une plus grande condensation de la chromatine (Dadoue, 2003).

Tnp1 est une protéine de 54 acides aminés (6,2 kDa) dont 20 % de lysine, 20 % d'arginine et aucune cystéine — excepté chez le cochon, le bélier et le taureau. Elle est très conservée entre les espèces. Cette protéine est très exprimée et sa distribution dans le noyau des spermatides est homogène. *In vitro*, Tnp1 fait diminuer la température de fusion de l'ADN, son ajout à de l'ADN lié à des nucléosomes décondense la chromatine et stimule l'activité de la topoisomérase I. De plus, il semble que Tnp1 stimule également la réparation des cassures simple brin de l'ADN. *In vivo*, les souris invalidées pour le gène codant pour Tnp1 ne présentent pas un phénotype marqué dans le noyau des spermatozoïdes, bien qu'une infertilité soit présente (Yu *et al.*, 2000). En effet, seul 40 % des mâles sont fertiles et le nombre de petits par portée est réduit (de 7,7 à 1,6 souriceaux) lors de croisements avec des femelles de même fond génétique (svj129). D'après les auteurs, cette infertilité

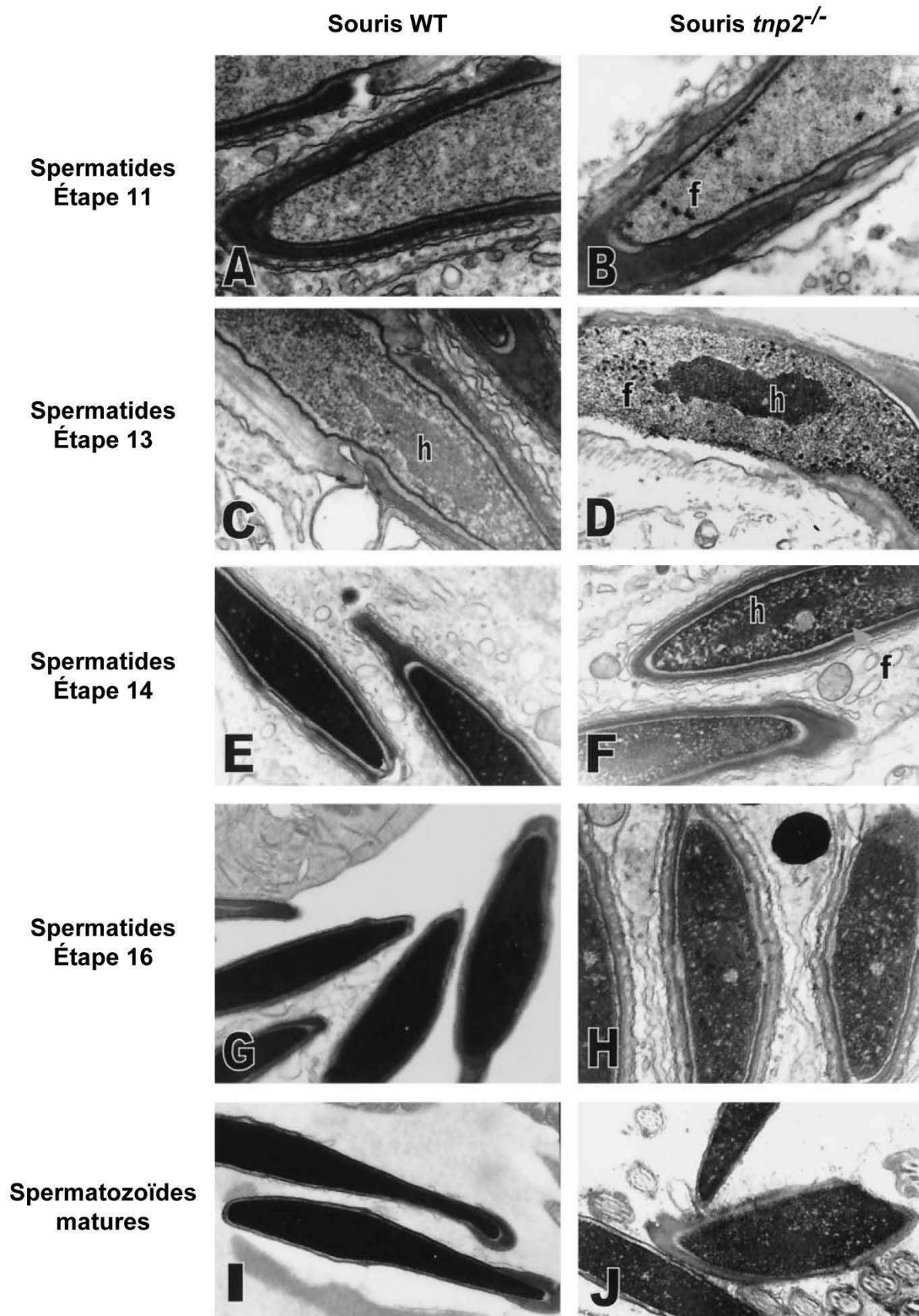


Figure 30 : La condensation de la chromatine des cellules germinales des souris *Tnp2*^{-/-}

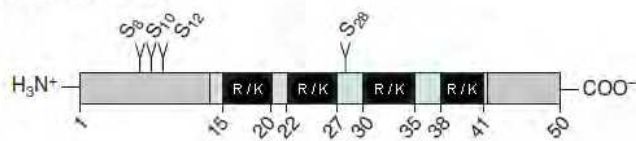
La condensation de la chromatine lors de la phase d'élongation des spermatides et chez les spermatozoïdes matures est observée par microscopie électronique à transmission chez les souris sauvages et invalidées pour *Tnp2*. f : Points focaux anormaux de condensation ; h : hétérochromatine péricentromérique différenciellement condensée. Grossissement : A, x25 000 ; B, x16 000 ; C, x31 000 ; D, x10 000 ; E, x12 000 ; F, x13 000 ; G, x11 000 ; H, x16 000 ; I et J, x12 000 (Zhao *et al.*, 2001).

serait principalement due à une diminution importante de la mobilité des spermatozoïdes. Au niveau du noyau des spermatides, ils ont noté une structure anormale de la chromatine en condensation avec la présence de points focaux en forme de bâtonnets au lieu d'une chromatine d'apparence fibrillaire régulière (figure 29). De plus, la chromatine des spermatozoïdes épididymaires est moins compactée que chez les souris sauvages (*wild-type* ; WT). En termes de composition en protéines des spermatides, ils ont observé une disparition normale des histones, mais une quantité de Tnp2 plus importante et une apparition prématurée de la pré-Prm2. Le processus de maturation par clivage de la pré-Prm2 (cf. § Les protamines) est également affecté : ils observent un retard du clivage entraînant une persistance de formes intermédiaires dans les spermatozoïdes épididymaires.

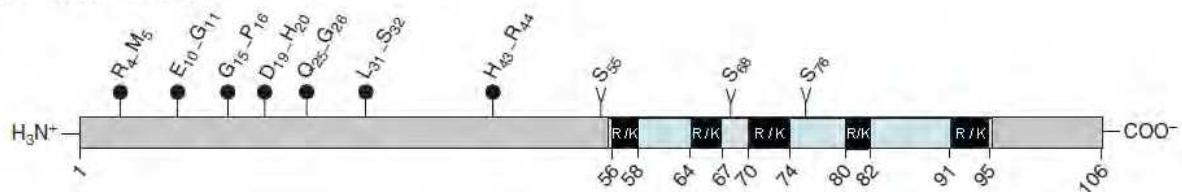
Tnp2 est deux fois plus grande que Tnp1, avec 117 à 138 résidus selon les espèces (≈ 13 kDa), et sa séquence est moins bien conservée. Elle est composée de 10 % de lysine, 10 % d'arginine, 5 % de cystéine, ainsi que de sérine et de proline. Elle comporte deux domaines en doigts de zinc dans la partie amino-terminale et la région carboxy-terminale est très basique. Son expression varie beaucoup entre les espèces. *In vitro*, Tnp2 augmente la température de fusion de l'ADN et son ajout cause une condensation de l'ADN nucléosomal. Tout comme Tnp1, elle permet un grand rapprochement des brins d'ADN et contribue ainsi à sa condensation par oligomérisation de brins d'ADN adjacents (Lévesque *et al.*, 1998). *In vivo*, l'invalidation du gène codant pour Tnp2 chez les souris ne les rend pas stériles, bien qu'on puisse constater une diminution de la taille des portées (de 7,4 à 3,9 souriceaux par portée) (Zhao *et al.*, 2001). Les spermatozoïdes présentent des défauts du flagelle avec une pièce intermédiaire « en épingle à cheveux » ou avec des fibres séparées. La chromatine des spermatides des souris *tnp2*^{-/-} commence à se condenser plus rapidement que chez les souris WT et possède une structure anormale (figure 30), proche de celle des souris *tnp1*^{-/-}. De plus, les spermatozoïdes épididymaires et du *vas deferens* montrent une chromatine moins condensée et irrégulière, avec la présence de lacunes. Les spermatides des souris *tnp2*^{-/-} subissent un retrait normal des histones, mais l'expression de Tnp1 augmente et le clivage de la pré-Prm2 n'est pas complet. Ainsi, dans les spermatozoïdes épididymaires, bien que la quantité totale de Prm2 soit normale, les formes intermédiaires de Prm2 sont toujours présentes alors qu'elles ne sont pas retrouvées chez les souris WT.

Les souris présentant une invalidation des deux gènes *tnp* sont stériles (Shirley *et al.*, 2004). Elles présentent une diminution drastique du nombre de spermatozoïdes épididymaires qui ont de plus des problèmes de mobilité, de viabilité et de morphologie. Les quantités de chaque forme de protamine n'ont pas pu être analysées dans les spermatozoïdes épididymaires des souris *tnp1*^{-/-};*tnp2*^{-/-}, mais, chez les souris homozygotes mutantes pour l'un des gènes et hétérozygotes pour l'autre, bien que la quantité de Prm2 ne soit pas modifiée, les formes de Prm2 présentes sont majoritairement celles non clivées et intermédiaires. Dans les spermatozoïdes épididymaires, la conséquence de cette absence de maturation normale de Prm2 chez les souris *tnp1*^{-/-};*tnp2*^{-/-} est la présence d'une chromatine peu condensée, ayant un aspect proche de celle des spermatides au début de leur condensation observées chez les souris *tnp1*^{-/-} et *tnp2*^{-/-}. L'utilisation de ces spermatozoïdes pour une fécondation *in vitro* par injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) montre une faible capacité fécondante des gamètes et les embryons obtenus ainsi présentent des défauts de développement associés à une faible viabilité. Par ailleurs, ces études ont souligné le fait que les fonctions des Tnp1 et Tnp2 ne sont pas complètement redondantes

A. Protamine 1



B. Protamine 2



- Domaine probable de liaison à l'ADN
- Y Site possible de phosphorylation
- Site de clivage post-traductionnel

Figure 31 : La structure des protamines chez la souris

Représentation schématique des domaines des protamines 1 (A) et 2 (B) de souris. Les sites riches en arginine et en lysine (R/K) sont en noir (Balhorn, 2007).

puisque, comparées aux souris *tnp1*^{-/-} et *tnp2*^{-/-}, les souris *tnp1*^{+/-};*tnp2*^{+/-} ont une fertilité normale et moins de défauts de morphologie, de mobilité et de viabilité des spermatozoïdes.

- Les protamines

Les protéines de transition sont ensuite à leur tour remplacées par les protamines. Ces petites protéines (environ 50 résidus) hautement basiques semblent elles aussi partager un gène ancestral commun avec H1. Au cours du temps, la séquence et la structure des protamines ont beaucoup évoluées entre les différentes espèces invertébrés et vertébrés. Deux différents types de protamines ont été caractérisés chez les mammifères : Prm1 et Prm2. Prm1 est exprimée par tous les mammifères, tandis que Prm2 n'est exprimée que par certaines espèces dont les primates, certains rongeurs, le lapin, le lièvre et le cheval. Bien que le taureau et le cochon possèdent un gène codant pour Prm2, celui-ci n'est pas fonctionnel. Comme nous l'avons vu précédemment, chez la souris, le rat et l'homme, les gènes codant pour Prm1 et Prm2 sont situés dans un cluster avec *tnp2* et *prm3*, qui sont transcrits en même temps. Le gène codant pour Prm3 produit une protéine qui n'a des protamines que le nom : c'est une petite protéine acide qui est cytoplasmique. Les ARNm des Prm sont eux aussi conservés plusieurs jours sous forme de ribonucléoprotéines avant d'être traduits.

La protéine Prm 1 est produite sous sa forme mature. Elle possède un domaine central très conservé riche en arginine qui se lie à l'ADN et qui est entouré de courts segments riches en cystéines (figure 31). Prm2, elle, est synthétisée sous la forme d'un précurseur. Cette pré-Prm2 est maturée par des clivages successifs, retirant près de 40 % de la partie amino-terminale. Chez l'homme et la souris, la pré-Prm2 subit six étapes de clivage pour former la Prm2 mature. Selon les espèces, des proportions variables de certaines formes intermédiaires de Prm2 peuvent être retrouvées dans les spermatozoïdes épидидymaires. Par ailleurs, chez l'homme, la souris et le hamster, Prm2 peut se lier à du zinc par sa partie carboxy-terminale.

Lors de leur synthèse, les Prm sont phosphorylées afin de permettre leur liaison à l'ADN. Comme pour les Tnp, la déphosphorylation des Prm déposées sur l'ADN augmente leur affinité pour celui-ci, accroissant la condensation de la chromatine des spermatides.

d. L'architecture nucléaire spermatique

Les protamines mises en place sur l'ADN spermatique durant la phase d'élongation de la spermiogenèse vont radicalement modifier la conformation et l'organisation spatiale de la chromatine spermatique. Ceci va permettre aux spermatozoïdes libérés dans la lumière des tubules séminifères de posséder un ADN environ 10 fois plus condensé que celui d'une cellule somatique. L'ADN spermatique est donc peu accessible, ce qui le protège, et prend peu de place, optimisant la future mobilité des gamètes dans le tractus reproducteur femelle.

Malgré cette compaction accrue de l'ADN, celui-ci doit rester hautement organisé dans l'espace pour que les différents brins ne soient pas emmêlés lors de la décondensation rapide qui suit la fécondation. Ceci permettra une utilisation presque immédiate du génome paternel par le zygote. Ainsi, tout comme dans les cellules somatiques, la chromatine spermatique possède une organisation définie bien qu'encore mal connue, que nous allons maintenant décrire.

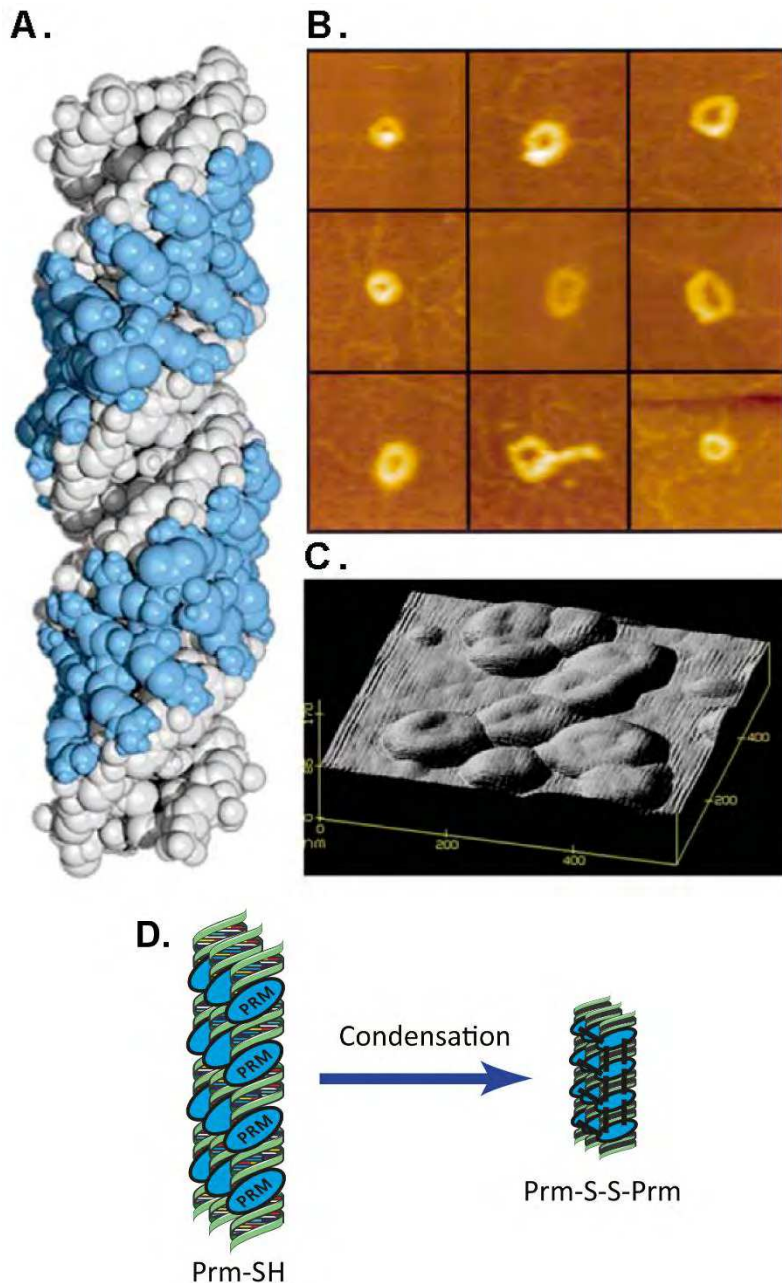
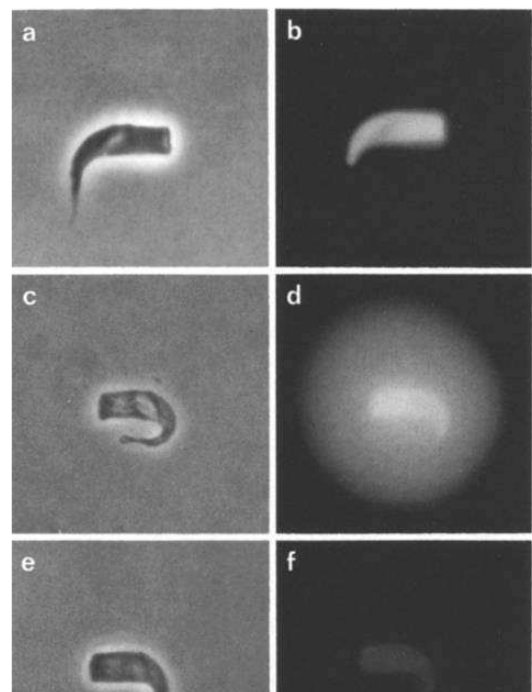


Figure 32 : La liaison de la protamine à l'ADN et son rôle dans la condensation

Les expérimentations *in vitro* de formation de nucléoprotamines ont permis de modéliser la liaison de Prm1 à l'ADN (A, Prm de saumon). Prm1 s'enroule autour de la double hélice d'ADN en suivant l'un des sillons, probablement le plus grand. Cette liaison permet de courber l'ADN et le fait s'enrouler comme un ressort courbe dont les extrémités se rejoignent pour former un tore. Ces tores d'ADN ont été observés *in vitro*, à partir de nucléoprotamines de taureau reconstituées (B, Allen *et al.*, 1997) et à partir de chromatine native humaine observée par microscopie à balayage (Balhorn, 2007). La capacité des protamines à former des ponts disulfures entre-elles permettrait de rapprocher les fibres d'ADN entre-elles et donc de condenser le génome (D).

Figure 33 : Le halo de boucles d'ADN spermatique

Photographies en contraste de phase (a, c) et en microscopie à fluorescence (b, d) de spermatozoïdes de hamster traités (c, d) ou non (a, b) avec du DTT et une forte concentration en NaCl pour décondenser l'ADN (Ward *et al.*, 1989).



➤ *Les nucléoprotamines et leur organisation spatiale*

Des études structurales des protamines et de l'ADN lié aux protamines ont été menées plus particulièrement sur Prm1 chez le taureau et la protamine de saumon. Cependant, actuellement, aucune donnée cristallographique détaillée n'a pu être obtenue à cause de l'insolubilité du complexe ADN/Prm. Par spectrométrie Raman, il a été établi que Prm1 ne possède pas de structure définie lorsqu'elle est en solution. C'est uniquement lors de son association à l'ADN qu'elle adopte une conformation stable. La façon dont Prm1 se fixe à l'ADN est encore mal définie mais il semblerait qu'elle s'enroule autour du double brin d'ADN en se positionnant dans l'un des sillons de la double hélice *via* des liaisons hydrogènes et électrostatiques, à raison d'une protamine par tour d'hélice (~11 pb). La plupart des travaux indiquent qu'elle se fixe dans le grand sillon (figure 32A) donnant ainsi une courbure à la fibre d'ADN. Après sa fixation, Prm1 forme des ponts disulfures intra-protéiques entre cystéines qui stabilisent sa liaison à l'ADN, avant de s'associer par des ponts disulfures inter-protéiques aux Prm situées sur d'autres fibres d'ADN adjacentes.

Par microscopie de force atomique, il a été montré que l'ajout de protamines de taureau à de l'ADN linéaire fixé sur un substrat de mica entraînait la formation d'un tore d'ADN (tube courbe refermé sur lui-même comme un donut) d'un diamètre d'environ 40 nm, dont chaque spire comprend de 360 à 370 pb (figure 32B) (Allen *et al.*, 1997). D'autres expériences du même type semblent indiquer qu'un tore d'ADN obtenu à partir de protamines de taureau peut enrouler un filament de 50 kb environ (Brewer *et al.*, 1999). Ces tores ont également été observés par microscopie électronique à balayage (MEB) sur des extraits de chromatine spermatique native humaine (figure 32C) (Balhorn, 2007).

Contrairement à Prm1, Prm2 peut lier le zinc et certains travaux semblent indiquer que le zinc est un facteur pouvant influencer la fertilité chez l'homme (Björndahl & Kvist, 2010). Il a également été montré que, pour plusieurs espèces, le contenu en atomes de zinc d'un spermatozoïde est d'environ un pour une Prm2 (Bench *et al.*, 2000). Ainsi, certains modèles proposés pour décrire la liaison des protamines et de l'ADN spermatique suggèrent que si les Prm1 sont liées entre elles par des ponts disulfures, *via* leurs cystéines, pour assembler deux brins d'ADN (figure 32D), les Prm2 seraient, elles, liées par des ponts salins de types « doigts de zinc » (Björndahl & Kvist, 2010).

Ainsi, les protamines permettent d'apporter à l'ADN une conformation en tores et cette dernière est stabilisée et condensée par des ponts disulfures intra- et inter-protamines et par la fixation de zinc aux Prm2. Des données obtenues par l'équipe de Steven Ward (University of Hawaii, Honolulu, USA) durant les vingt dernières années avec des spermatozoïdes de hamster ont révélé que la taille maximale supposée d'un tore obtenu *in vitro* est d'environ 50 kb. En soumettant les spermatozoïdes épидидymaires de hamster à un traitement au dithiothréitol (DTT, agent réducteur des ponts disulfures et chélateur de zinc) et à une forte concentration en NaCl, ils ont extrait les protamines du noyau. Ceci a provoqué la sortie de larges boucles d'ADN autour du noyau qui ont alors formé un halo observable en présence de bromure d'éthidium (figure 33) (Ward *et al.*, 1989). La mesure de ce halo a permis de déterminer que les boucles obtenues correspondaient à une longueur moyenne de 46 kb, ce qui est très proche des mesures des tores effectuées *in vitro* quelques années plus tard. Par la suite, ils ont déterminé que les spermatozoïdes humains soumis au même traitement présentaient un halo de boucles de 27 kb en moyenne (Barone *et al.*, 1994).

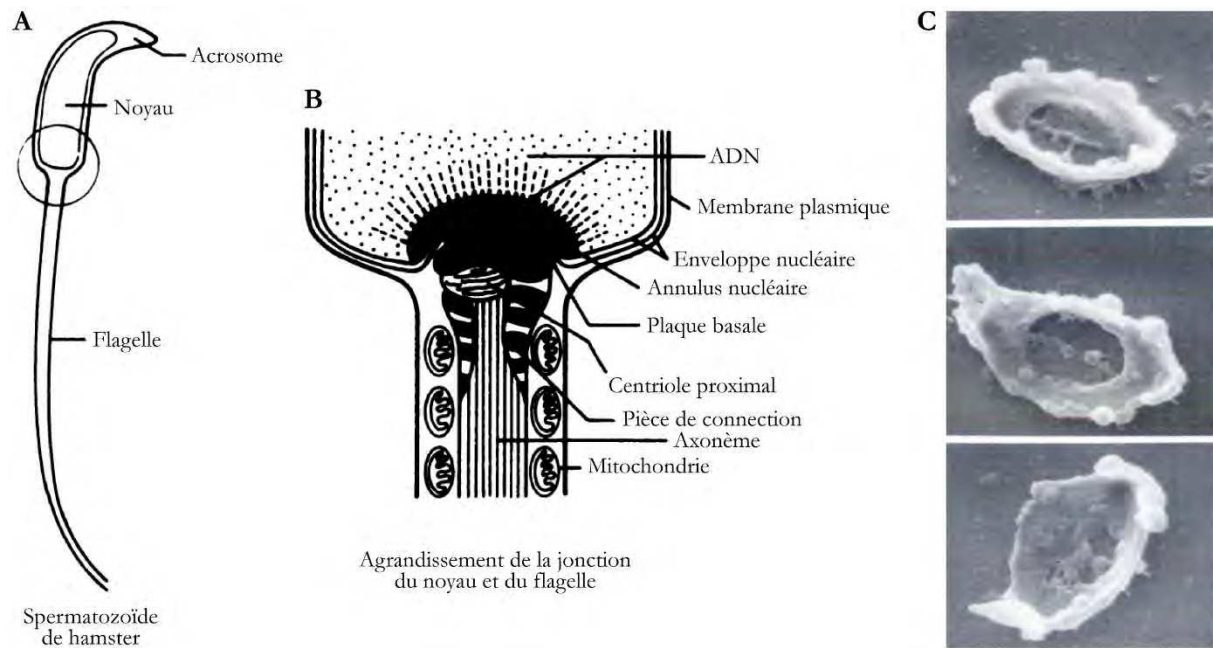


Figure 34 : L'annulus nucléaire spermatique

L'annulus nucléaire, une structure située à la base du noyau spermatique, a été isolé à partir de spermatozoïdes de hamster (A). Sa localisation à la jonction de la tête et du flagelle est représentée schématiquement en B. Des annuli spermatiques isolés de hamster ont ainsi pu être observés par microscopie électronique à balayage (C) (Ward & Coffey, 1989).

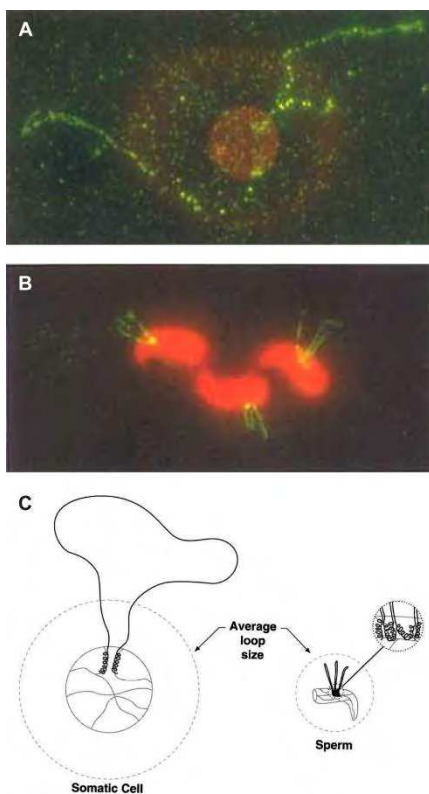


Figure 35 : L'organisation du locus des gènes de l'ARNr 5S chez le hamster

Observation de halo d'ADN d'une cellule du foie (A), de spermatozoïde de hamster (B) où l'ADN est marqué au iode de propidium et le locus de l'ARNr 5S par une sonde biotinylée révélée en FITC. L'organisation de ce locus particulier de l'ADN est représentée schématiquement dans une cellule somatique et un spermatozoïde (C) (Nadel *et al.*, 1995).

Ces données suggèrent aussi que ces boucles d'ADN, qui semblent correspondre à des tores stabilisés par les Prm, sont maintenues à leur base par une structure interne du noyau. Ward et collègues ont proposé que les extrémités de chaque tore soient associées à une matrice nucléaire semblable à celle contenue dans le noyau des cellules somatiques. Ils ont par la suite montré que l'ADN lié à la matrice nucléaire entre chaque tore était sensible à la digestion par les nucléases (DNaseI, TOPO II β , enzymes de restriction) comme c'est le cas pour les séquences MAR dans les cellules somatiques (Sotolongo *et al.*, 2003). De plus, chez le hamster, la souris, l'homme et le Xénope, ils ont pu isoler une structure protéique interne au noyau spermatique à laquelle est fixée l'ADN par des séquences spécifiques encore peu étudiées. Cette structure située à la base du noyau spermatique, au niveau du site de fixation du flagelle, a été baptisée *annulus* nucléaire à cause de sa forme en anneau courbé (à ne pas confondre avec l'*annulus* du flagelle, figure 34) et les séquences d'ADN qui y sont liées sont des *nuclear annulus-DNA sequences* ou séquence NA-ADN (Ward & Coffey, 1989). Il semble donc, d'après le modèle proposé par Ward *et al.*, que la chromatine spermatique des rongeurs est organisée à l'intérieur du noyau en tores de 50 kb attachés à leur base par des MAR à une matrice nucléaire dont fait partie l'*annulus* nucléaire.

Des études de ces MAR dans le noyau spermatique ont démontré qu'elles étaient spécifiques des cellules spermatiques. Ainsi, chez le hamster, l'utilisation d'une sonde fluorescente spécifique du gène codant pour l'ARNr 5S, répété 1 350 fois sous forme d'un cluster sur un locus unique, a permis d'observer l'organisation en boucles de ce locus au sein de cellules somatiques et spermatiques. Dans les cellules somatiques diploïdes de foie et de cerveau, ce locus est localisé sur deux larges boucles d'ADN séparées l'une de l'autre, correspondant à deux chromosomes homologues. Dans les spermatozoïdes haploïdes des mêmes animaux, ce locus est réparti sur trois boucles d'ADN dont les bases sont co-localisées (figure 35) (Nadel *et al.*, 1995). Les MAR spermatiques sont donc différentes des MAR somatiques.

L'une des fonctions possibles de ces MAR spermatiques serait de réguler la transcription des gènes dans les spermatides lors de la spermiogenèse et peut-être même durant le développement précoce du zygote après la fécondation. Par exemple, le locus où se situe le cluster des gènes des Prm et de Tnp2 est encadré par deux séquences MAR, spécifiques des cellules germinales haploïdes, qui interviennent dans la régulation de la transcription de ces gènes dans les spermatides rondes (Martins *et al.*, 2004).

De plus, certains travaux complémentaires chez la souris ont montré l'importance de l'association physique entre ces séquences d'ADN et la matrice nucléaire spermatique lors de la formation des pronucléi et la réplication de l'ADN du zygote suivant la fécondation. En effet, l'injection intracytoplasmique dans un ovocyte d'ADN spermatique nu seul ou co-injecté avec une matrice nucléaire spermatique isolée ne permet pas la formation du pronucléus mâle, ni sa réplication, tandis que l'injection de matrice nucléaire spermatique uniquement associée aux courts fragments d'ADN à la base des tores (donc des fragments d'ADN associés aux MAR spermatiques) autorise la formation du pronucléus mâle et sa réplication, malgré une dégradation de l'ADN spermatique allant de 20 à 50 % (Shaman *et al.*, 2007a, 2007b).

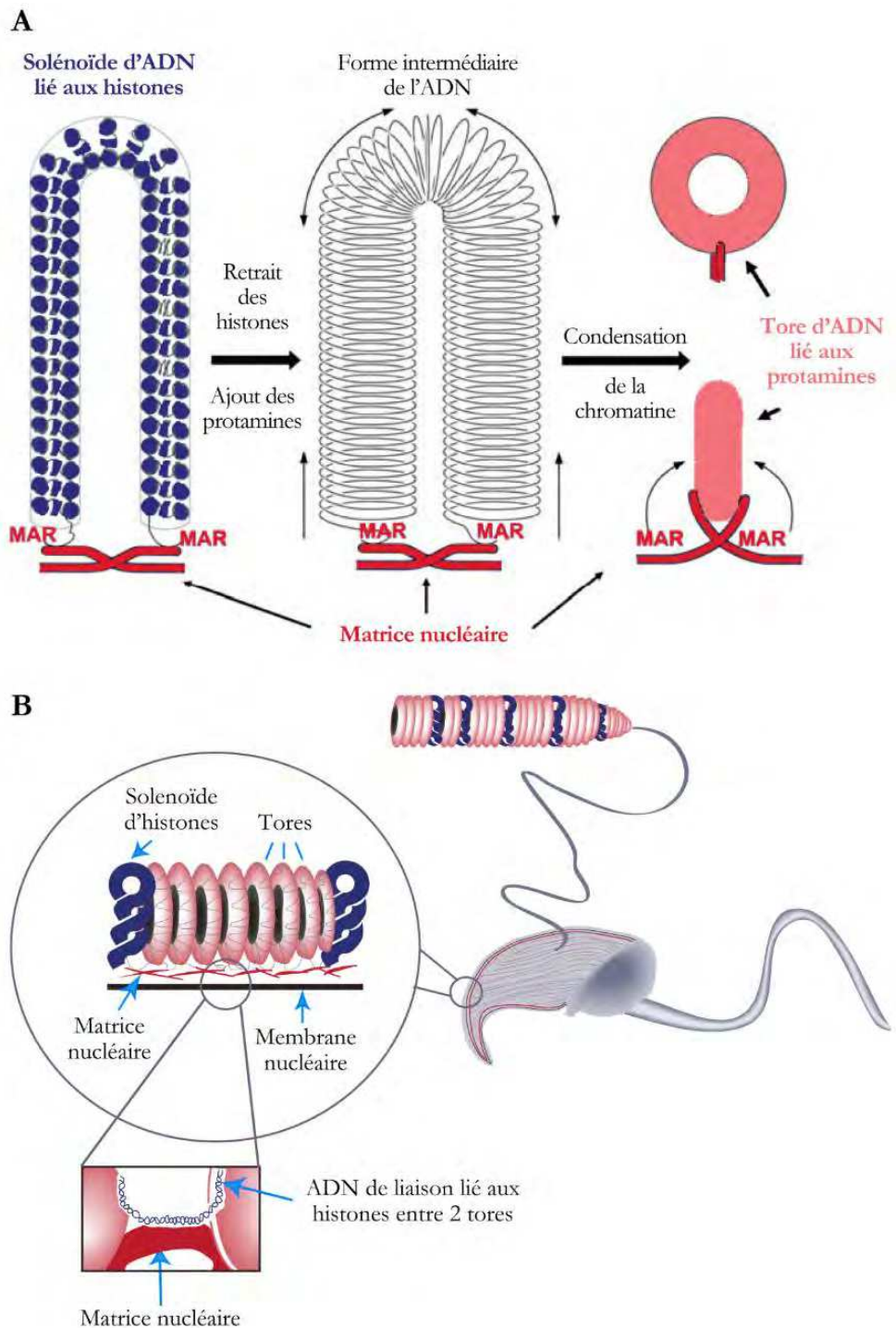


Figure 36 : L'organisation de la chromatine spermatique

Le modèle communément admis de la mise en place de l'organisation de la chromatine spermatique lors de la spermiogenèse est représenté de façon schématique (A, Ward, 2010), ainsi que cette organisation dans les spermatozoïdes matures (B).

➤ *Les nucléosomes persistants*

Lors de la spermiogenèse, toutes les histones ne sont pas retirées. Une petite portion du génome contenu dans le noyau des spermatozoïdes reste associée à des nucléosomes composés d'histones canoniques et de variants d'histones. Selon les espèces, la quantité d'histones retenues est variable. Chez la souris, elle est évaluée à 2 %, tandis que chez l'homme, les premières données indiquaient une rétention de 10 à 15 % des histones (Tanphaichitr *et al.*, 1978). Les nucléosomes spermatiques persistent également dans le zygote, après que toutes les protamines aient été remplacées à nouveau par des histones moins de 4 heures après la fécondation. Elles font donc partie de l'héritage paternel du futur enfant et ont un rôle potentiel dans le développement embryonnaire.

Récemment, des données obtenues par des stratégies d'analyse globale du génome (immunoprécipitation de chromatine, puce à ADN, séquençage à haut débit) ont permis de déterminer que les histones persistant après la spermatogenèse ne sont pas distribuées au hasard et ne sont donc pas le résultat d'un défaut de leur remplacement par les protamines (Arpanahi *et al.*, 2009 ; Hammoud *et al.*, 2009, 2011). Elles sont enrichies dans des régions comportant en fait un mélange de nucléosomes et de nucléoprotamines. Ces régions enrichies en histones semblent réparties soit en larges régions de 10 à 100 kb, soit en courts domaines dispersés dans tout le génome. La sensibilité des extrémités des tores à la DNaseI suggère d'ailleurs que ces séquences d'ADN attachées à la matrice nucléaire sont liées à des histones et pourraient correspondre à ces courtes séquences (Ward, 2010). De plus, Ward (2010) suggère que les longs *loci* comportant des histones possèdent une conformation spatiale différente des tores et les représente comme des solénoïdes (figure 36).

Une analyse bioinformatique des séquences concernées par un enrichissement en nucléosomes a permis de mettre en évidence que les histones étaient surtout retrouvées au sein des promoteurs de gènes impliqués dans le développement précoce de l'embryon (facteurs de transcription, voies de signalisation, gènes HOX ...), de gènes codant pour des microARN (miARN), de gènes à empreinte parentale et de gènes participant à la spermatogenèse (Hammoud *et al.*, 2009). Une analyse plus détaillée des modifications et des variants d'histones retrouvés aux différents *loci* a montré une répartition bien précise de ces différentes marques épigénétiques. Ainsi, le variant TH2B est principalement retrouvé dans le promoteur des gènes impliqués dans la maturation, le fonctionnement et la capacitation des spermatozoïdes et ceux importants dans la fécondation, mais jamais dans le promoteur des gènes intervenant dans le développement embryonnaire. Le variant H2A.Z, lui, est uniquement enrichi dans les régions de l'hétérochromatine péri-centromérique. Si on s'intéresse maintenant aux modifications des histones canoniques, H3K4me2 est retrouvée dans le promoteur des gènes des facteurs de transcription impliqués dans le développement, tandis que H3K9me3 ne se situe pas près des gènes mais dans les régions péri-centromériques comme H2A.Z (Hammoud *et al.*, 2009).

➤ *L'organisation des chromosomes*

Ces vingt dernières années, des travaux utilisant la technique du FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) sur des spermatozoïdes humains ont montré que les différents chromosomes condensés sous formes de tores liés à la matrice nucléaire spermatique possèdent tous une conformation et une position définies au sein du noyau (figure 37).

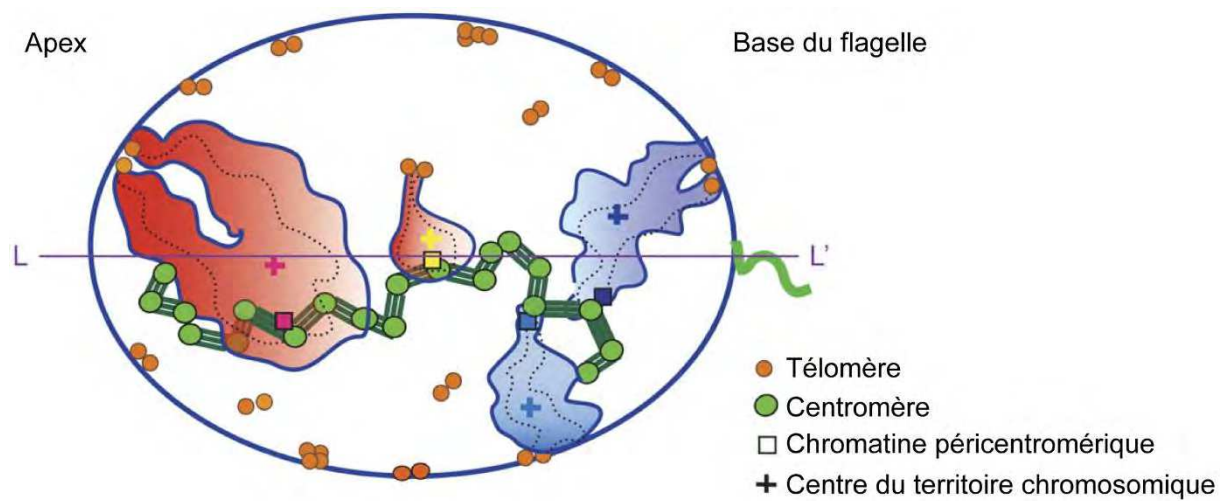


Figure 37 : Un modèle d'organisation des chromosomes dans les spermatozoïdes humains

Les zones denses (lignes en pointillés) des territoires chromosomiques sont en forme d'épingle à cheveux. Les télomères des deux bras des chromosomes s'associent en dimères à la périphérie du noyau spermatique. De façon générale, il semble que les chromosomes riches en gènes (rouges) soient situés vers l'apex du noyau et que les chromosomes pauvres en gènes (bleus) soient plutôt localisés à la base du noyau. Les centromères des chromosomes sont également associés au centre du noyau selon un ordre plus ou moins précis le long de l'axe longitudinal LL' (Mudrak *et al.*, 2012).

En effet, il semblerait que les centromères des différents chromosomes soient tous situés au centre du noyau, tandis que les télomères seraient localisés à la périphérie (Zalensky *et al.*, 1993). De plus, les deux télomères d'un même chromosome semblent associés en dimère. L'utilisation de sondes des deux bras d'un même chromosome a montré que ceux-ci sont co-localisés dans une même région très restreinte du noyau spermatique. Les auteurs de ces travaux proposent que les deux bras d'un chromosome soient accolés ou entremêlés entre-eux de façon anti-parallèle (Mudrak *et al.*, 2005). Chaque chromosome formerait donc une sorte de boucle fermée, positionnée sur un axe allant du centre du noyau à la périphérie.

Il semble également que les chromosomes ne soient pas disposés au hasard les uns par rapport aux autres. Ils occuperaient une position précise au sein du noyau et ne seraient pas emmêlés les uns aux autres. Ainsi, d'après les études statistiques, quel que soit le spermatozoïde étudié dans un échantillon et quel que soit l'individu, les positions relatives des chromosomes, qu'ils soient autosomiques ou sexuels, resteraient sensiblement les mêmes (Mudrak *et al.*, 2012). Chez l'homme, l'ordre des centromères de certains des chromosomes le long de l'axe antéro-postérieur du noyau spermatique a donc pu être établi : 17 ; 1 ; X ; 19 ; Y ; [(22 ; 21 ; 18) ; (3 ; 4)] (Millan *et al.*, 2012 ; Mudrak *et al.*, 2012). De plus, l'observation des chromosomes de quelques rares spermatozoïdes diploïdes a permis de montrer que cet ordre était identique entre les deux ensembles de chromosomes au sein d'un même noyau et qu'il était également identique entre les spermatozoïdes haploïdes et diploïdes. Ceci suggère que l'organisation des chromosomes dans le noyau est effectuée lors de la méiose (Mudrak *et al.*, 2012).

Cette organisation complexe de la chromatine et des chromosomes est un fait acquis lorsque la phase d'élongation des spermatides se termine. Les spermatides possèdent alors une chromatine très condensée grâce aux nombreuses protamines qui la structurent. Après le processus de spermiation, les spermatides allongées relâchées dans la lumière du tubule séminifère sont appelées des spermatozoïdes. Cependant, bien que leur morphologie extérieure soit presque aboutie, ils ne sont pas encore matures : ils n'ont pas de pouvoir fécondant et ne sont pas mobiles. L'acquisition de ces caractéristiques essentielles pour leur fonction se produira lors de leur transit dans le long tubule à la sortie du testicule : l'épididyme.

3. La maturation spermatique épидидymaire

a. L'épididyme

➤ *L'anatomie et l'histologie*

L'épididyme est un organe situé sur la face postérieure du testicule. Il est composé d'un unique tubule fortement contourné, dont la longueur varie beaucoup entre les différentes espèces de mammifères : environ 1 m chez la souris, 3,5 m chez le rat, 6 m chez l'homme et 60 m chez le ver. Il permet de relier les canaux efférents, chargés de réabsorber une grande partie du fluide testiculaire, au canal déférent, qui transporte les spermatozoïdes matures de leur lieu de stockage à la prostate lors de l'éjaculation. L'épididyme est composé de trois régions : la tête, le corps et la queue (figure 38A). Chacune de ces parties est elle-même subdivisée en segments anatomiquement séparés par des travées conjonctives, les *septa* (Abou-Haïla & Fain-Maurel, 1984). D'après Johnston *et al.* (2005), chez la souris, ces segments anatomiques sont au nombre de dix et l'analyse de

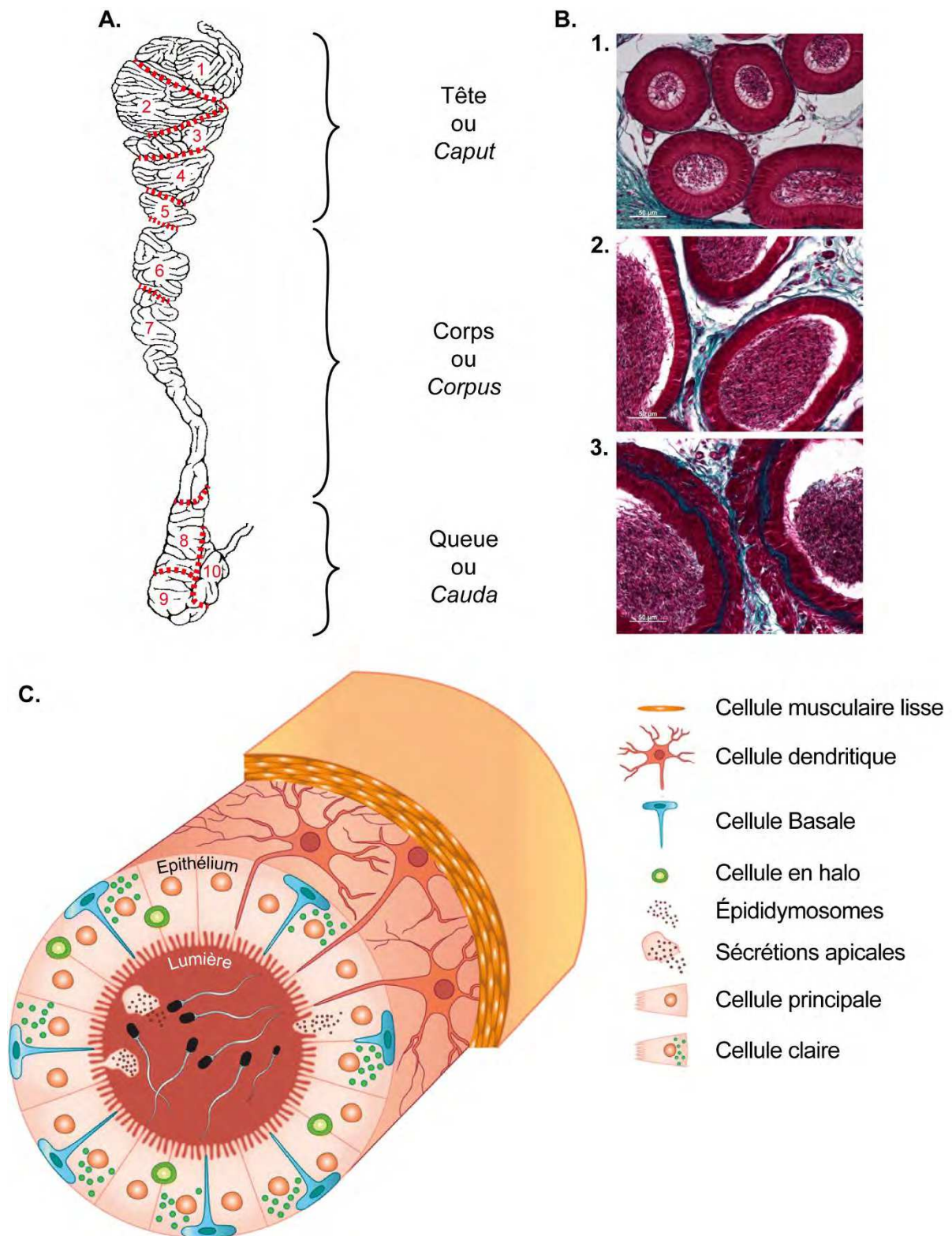


Figure 38 : L'épididyme

- A. Représentation schématique de l'épididyme de souris et de sa régionalisation en 10 segments (Johnston *et al.*, 2005).
- B. Coupes histologiques de la tête (1), du corps (2) et de la queue (3) de l'épididyme de souris, colorées au trichrome de Masson-Goldner.
- C. Schéma de l'épithélium épididymaire pseudo-stratifié (Belleannée *et al.*, 2012).

l'expression génique en fonction de chaque segment a permis de distinguer six régions formant chacune une unité transcriptionnelle et probablement fonctionnelle. Ces six régions présentant un profil d'expression génique qui leur est propre sont composées d'un ou plusieurs segments (S) : S1, S2, S3, S4/5/6, S7 et S8/9/10.

L'épithélium formant la paroi de l'épididyme est pseudo-stratifié, cylindrique et repose sur une membrane basale (figure 38B-C). Sa hauteur varie entre la tête et la queue de l'épididyme : l'épithélium est épais dans la tête et fin dans la queue de l'épididyme. Le tubule est entouré sur toute sa longueur de cellules musculaires lisses permettant de soumettre l'épididyme à des contractions péristaltiques, afin d'assurer la progression des gamètes, et expulsant les spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme au moment de l'éjaculation. L'épithélium est composé de différents types cellulaires possédant des fonctions spécifiques et dont la proportion varie dans chaque segment en fonction des rôles physiologiques de celui-ci. Les cellules principales, majoritaires, sont liées entre elles au pôle apical par des jonctions serrées et des desmosomes qui forment la barrière hémato-épididymaire, permettant de protéger les spermatozoïdes d'une réponse auto-immune originaire du compartiment systémique et de contrôler les apports provenant du compartiment sanguin. La présence de cellules dendritiques entourant le tubule de l'épididyme a été récemment démontrée. Ces cellules émettent des prolongements entre les cellules épithéliales pouvant atteindre la lumière où transitent les spermatozoïdes. La fonction de ces cellules dendritiques dans la physiologie de l'épididyme n'est pas encore connue (Da Silva *et al.*, 2011).

Les **cellules principales** représentent 65 à 80 % des cellules en fonction des segments. Ce sont des cellules en colonne présentant de nombreuses microvillosités et un noyau en position basale. L'apparence et l'organisation de leurs organites varient en fonction des régions de l'épididyme, en particulier ceux impliqués dans la sécrétion (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi,...) et dans l'endocytose (endosomes, lysosomes,...) (Hermo & Robaire, 2002). Elles ont un rôle important dans la maturation des spermatozoïdes par leurs intenses activités de sécrétion et d'endocytose qui régulent la composition du fluide épididymaire.

Les **cellules apicales**, retrouvées principalement dans le segment 1, présentent un noyau en position apicale, d'où leur nom. Il semble qu'elles ne traversent pas toujours l'épithélium, ainsi certaines ne sont pas en contact avec la membrane basale. Leurs microvillosités sont courtes et peu nombreuses. Ces cellules sont en revanche riches en mitochondries et en lysosomes. Elles seraient impliquées dans l'endocytose des éléments du fluide épididymaire et dans l'acidification de ce fluide (Martínez-García *et al.*, 1995).

Les **cellules basales** sont des petites cellules hémisphériques, situées à la base de l'épithélium, qui peuvent être en contact avec la lumière du tubule épididymaire par des prolongements cytoplasmiques. Elles sont présentes tout le long de l'épididyme et représentent 10 à 20 % de l'ensemble des cellules épididymaires selon les segments. Leur(s) fonction(s) n'a(ont) pas été déterminée(s) à ce jour. Il est possible qu'elles participent à la protection contre les radicaux libres (Veri *et al.*, 1993) et qu'elles soient capables de détecter la composition du fluide épididymaire afin de la réguler *via* un dialogue avec les autres types cellulaires de l'épithélium (Shum *et al.*, 2008).

Les **cellules claires** sont de larges cellules prismatiques qu'on retrouve principalement dans le corps et la queue de l'épididyme. Elles ont une forte activité d'endocytose et présentent donc un

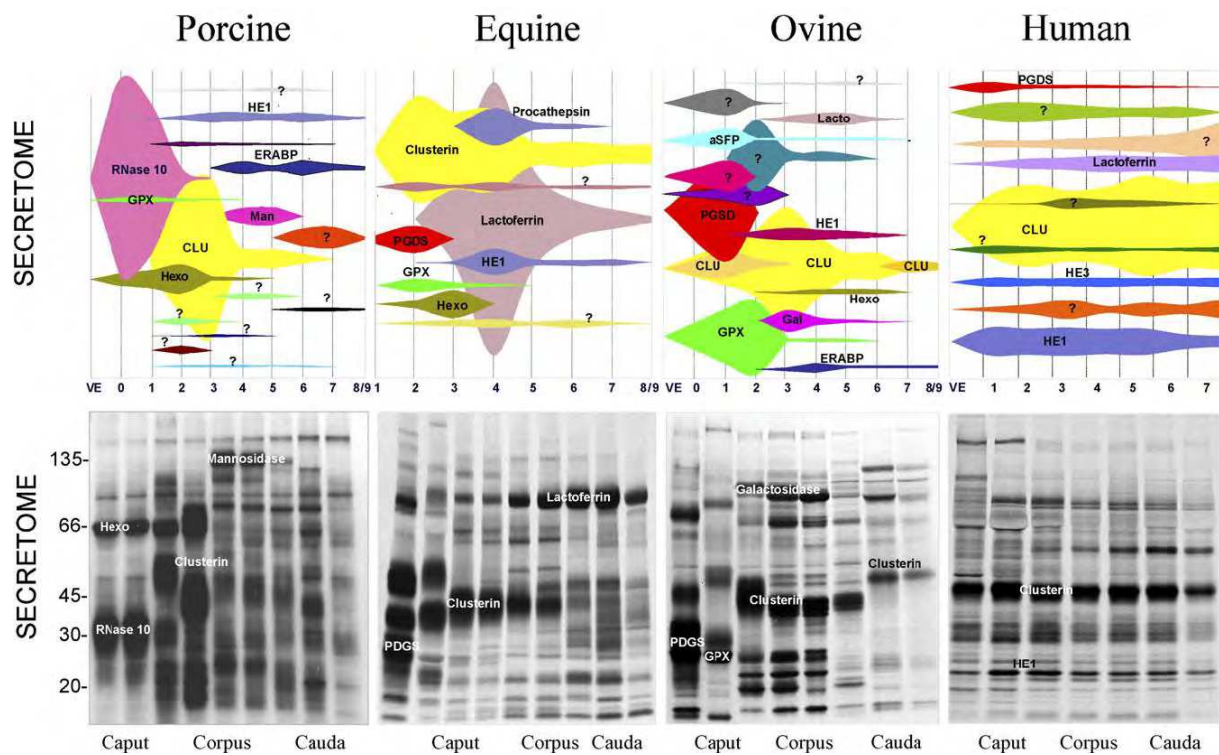


Figure 39 : L'évolution du sécrétome de l'épithélium épидидymaire de segment en segment

Les schémas représentant le sécrétome de chaque espèce (cochon, cheval, ovin, homme) indiquent, en fonction de la région de l'épididyme, l'expression des protéines en pourcentage par rapport à leur sécrétion totale dans tout l'organe. Le sécrétome de chaque espèce est également présenté sous forme de gel d'électrophorèse à 1 dimension dont chaque puits correspond à une région de l'épididyme. Il apparaît que les protéines sécrétées évoluent en fonction de chaque région de l'épididyme. Seul le sécrétome de l'homme semble moins sujet à une variation des sécrétions en fonction des segments de l'épididyme (Dacheux *et al.*, 2009).

grand nombre de vésicules et d'endosomes dans leur partie apicale, ainsi que des lysosomes dans leur partie médiane. Dans leur partie basale se trouvent le noyau et une accumulation de gouttelettes lipidiques en quantité variable. Leur activité d'endocytose serait liée à leur rôle dans l'absorption de certains éléments du fluide épидидymaire.

Pour finir, les **cellules en halo** sont rondes et de petites tailles. Elles sont présentes tout le long de l'épididyme et se situent vers la base de l'épithélium. Elles ont un cytoplasme réduit contenant un nombre variable de granules denses. Il s'agirait de lymphocytes T ou de monocytes (Hermo & Robaire, 2002).

➤ *Les fonctions*

À la fin de la spermatogenèse, les spermatozoïdes quittent le testicule et entrent dans les canaux efférents qui vont réabsorber une grande partie du fluide testiculaire. Ils rejoignent ensuite l'épididyme. Ils vont y transiter pendant 1 à 2 semaines, selon les espèces, jusqu'à rejoindre la queue de l'épididyme, où ils seront stockés entre deux éjaculations. La progression des spermatozoïdes pourtant immobiles est due à la fois à la pression du fluide entrant, produit en permanence par le testicule, et aux mouvements péristaltiques des fibres musculaires lisses qui entourent l'épithélium. C'est durant le transit que l'épididyme va assurer sa principale fonction : la maturation des spermatozoïdes. Ce processus est basé sur l'interaction constante des spermatozoïdes avec le fluide épидидymaire. La composition de celui-ci varie entre chaque segment, grâce aux activités de sécrétion et d'endocytose de l'épithélium spécifiques à chaque segment (figure 39). Ceci permet une maturation progressive des spermatozoïdes sur les plans morphologiques, biochimiques et fonctionnels.

La membrane cytoplasmique des gamètes va subir un profond remodelage lipidique et protéique, lui permettant d'être plus fluide et d'acquérir et/ou de modifier des protéines essentielles à la reconnaissance de l'ovocyte et à la fusion du spermatozoïde avec lui. Ainsi, on observe sur le plan lipidique :

- une perte de phospholipides, variable selon les différents types,
- une augmentation de la proportion d'acides gras polyinsaturés,
- une perte importante de cholestérol, contrebalancée par une acquisition de desmostérol, le dernier intermédiaire de la voie de biosynthèse du cholestérol,
- une diminution du rapport cholestérol/phospholipides, indiquant une augmentation de la fluidité membranaire (Saez *et al.*, 2011).

Les protéines, quant à elles, peuvent être éliminées, incorporées ou associées à la membrane, relocalisées ou modifiées (Dacheux *et al.*, 2003, 2009). Parmi ces modifications post-traductionnelles, générées par des enzymes et des molécules du fluide, se trouvent entre autres la phosphorylation, le pontage disulfure, la glycosylation et la protéolyse ménagée.

La morphologie des spermatozoïdes évolue également au cours du transit épидидymaire, surtout au niveau de la tête spermatique. Ainsi, chez certaines espèces, l'acrosome voit sa taille, sa forme et son contenu modifiés (Bedford & Nicander, 1971 ; Scarlett *et al.*, 2001 ; Olson *et al.*, 2003). La taille de la tête du spermatozoïde se réduit grâce à la perte d'eau par le gamète d'une part (hypertonie du fluide épидидymaire par rapport au spermatozoïde) et à la poursuite de la

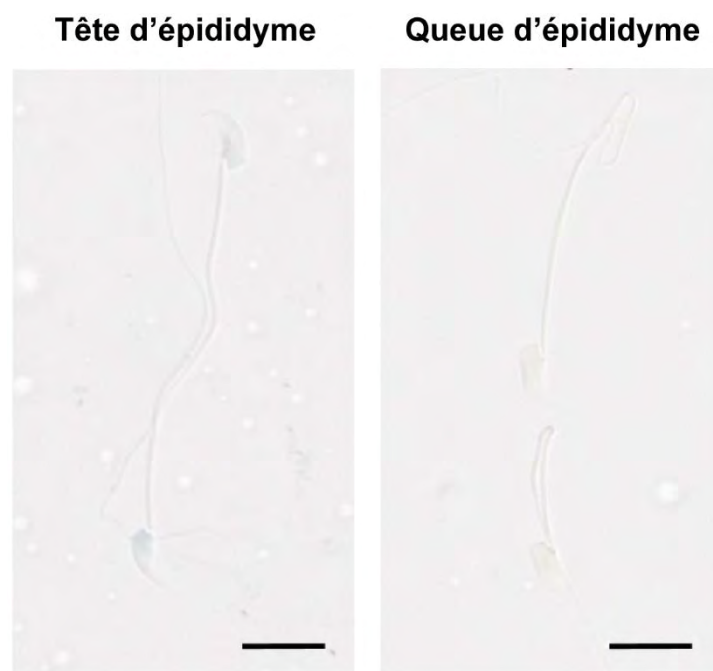


Figure 40 : La condensation de la chromatine spermatique lors du transit épидидymaire

Observation par microscopie optique de spermatozoïdes prélevés dans la tête et dans la queue de l'épididyme de souris et colorés avec du bleu de toluidine, un colorant ayant une forte affinité pour les charges négatives, donc pour l'ADN. Ces photographies indiquent une diminution de la coloration du noyau spermatique entre la tête et la queue de l'épididyme, synonyme d'une augmentation de la condensation de l'ADN contenu dans le noyau.

compaction de la chromatine d'autre part (figure 40), facilitant la mobilité du spermatozoïde dans le tractus femelle et protégeant l'ADN des attaques extérieures.

L'épididyme possède également une fonction primordiale de protection des spermatozoïdes. En effet, ces cellules sont quiescentes et ne peuvent pas réagir à leur milieu par elles-mêmes, puisque leur ADN est très fortement compacté et donc inaccessible pour la transcription et que leur cytoplasme et ses organites ont été éliminés lors de la spermiogenèse, limitant grandement les réserves d'enzymes de défenses et de réponse au stress. C'est donc l'épithélium épididymaire qui est chargé de finement contrôler l'environnement des spermatozoïdes, c'est-à-dire la composition du fluide, pour éviter toute atteinte des gamètes. L'un des stress majeurs rencontrés par les spermatozoïdes est le stress oxydant, généré par une concentration accrue en espèces oxygénées réactives (EOR). Nous verrons par la suite comment ce stress agit sur les gamètes et comment l'épididyme peut les en protéger (cf. Partie II).

b. La condensation de la chromatine spermatique épididymaire

Nous avons vu précédemment comment la chromatine spermatique évolue lors de la spermatogenèse, que ce soit durant la méiose avec l'incorporation de nombreux variants d'histones ou lors de la spermiogenèse avec le remplacement des histones par les protamines, afin de fortement condenser l'ADN. Cependant, comme nous venons de l'évoquer, la chromatine des gamètes continue à évoluer lors du transit épididymaire.

Peu de choses sont connues à l'heure actuelle sur la façon dont est poursuivie et régulée la condensation de la chromatine spermatique lors du transit épididymaire. La très forte diminution de la proportion en groupements thiols libres ($-SH$) entre les gamètes de la tête et de la queue de l'épididyme et le fait que les Prm soient riches en résidus Cys porteurs de $-SH$ suggèrent que la condensation accrue de la chromatine des spermatozoïdes durant le transit épididymaire pourrait être due à une activité de pontage disulfure entre les Prm au sein du noyau spermatique. Ceci rapprocherait les différentes fibres d'ADN entre-elles et stabiliserait leur conformation spatiale afin de les rendre moins accessibles à de potentiels dangers et plus résistantes. Ainsi, l'ADN nucléaire spermatique serait moins sensible aux dommages induits par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) que l'ADN nucléaire de cellules somatiques (Sawyer *et al.*, 2003). À l'appui de cette hypothèse, une protéine nucléaire spermatique connue pour avoir une activité de pontage disulfure, la *sperm nucleus glutathione peroxidase 4* (snGPx4 ou *nuclear phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase* [nPHGPx]), et mise en place dans le noyau spermatique au moment de la spermatogenèse a été mise en évidence (Conrad *et al.*, 2005).

Cette enzyme appartient à la famille des glutathion peroxydases, qui sont habituellement chargées d'éliminer les EOR. Elles sont capables de catalyser la transformation de H_2O_2 en H_2O , ainsi que d'autres hydroperoxydes ($ROOH$) en alcools (ROH) et en H_2O . Cette réaction enzymatique nécessite deux molécules de glutathion (GSH), un tripeptide comportant une cystéine, qui fourniront chacune un hydrogène lors de la réaction. Les deux molécules de GSH ainsi oxydées seront alors assemblées par un pont disulfure sous forme de GSSG.

Il semble que la protéine snGPx4 soit capable de réaliser cette réaction de transformation des EOR et des hydroperoxydes en n'utilisant pas le GSH, mais les groupements thiols des Prm

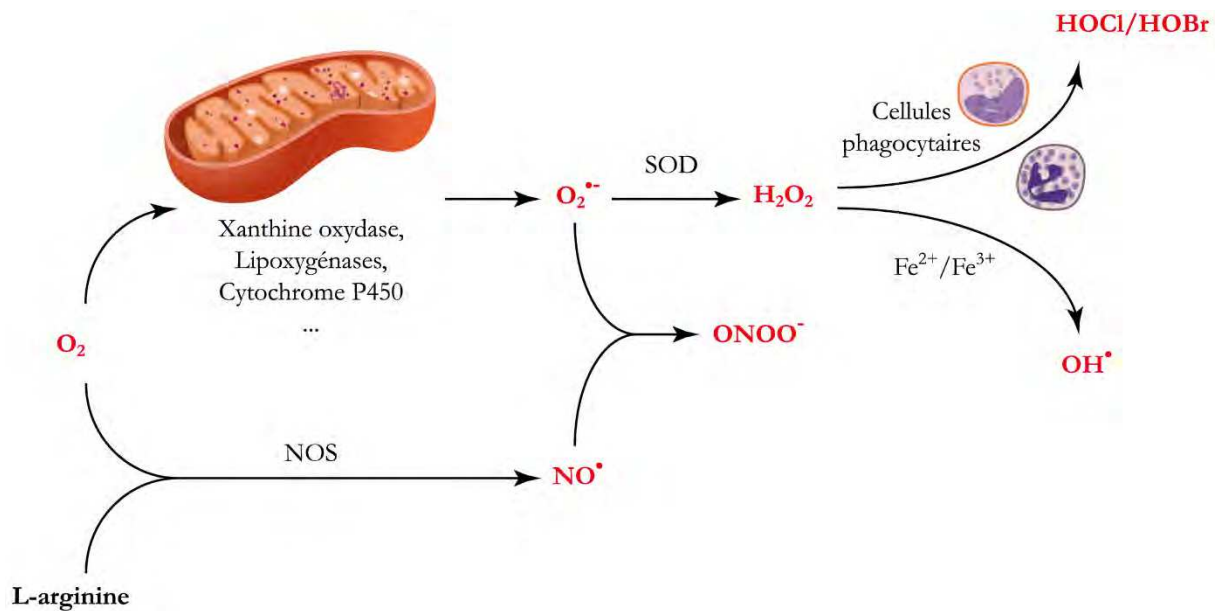


Figure 41 : La formation des EOR

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; $HOBr$: acide hypobromeux ; $HOCl$: acide hypochloreux ; NO^{\bullet} : monoxyde d'azote ; NOS : nitric oxide synthase ; O_2 : dioxygène ; $O_2^{\bullet-}$: anion superoxyde ; OH^{\bullet} : radical hydroxyle ; $ONOO^-$: peroxynitrite ; SOD : superoxyde dismutase.

comme donneurs d'hydrogène. SnGPx4 formerait ainsi un pont disulfure entre les cystéines des Prm, rapprochant les brins d'ADN auxquels elles sont liées et condensant la chromatine spermatique.

Les EOR nécessaires à cette réaction interviennent à plusieurs reprises lors de la maturation des spermatozoïdes et sont indispensables à l'acquisition de leur fonction. Cependant, ce sont également des molécules instables qui provoquent de nombreux dommages dans les cellules, au point, parfois, de causer une perte de fonction ou d'induire l'apoptose. Or, comme nous l'avons évoqué, les spermatozoïdes ne peuvent pas se défendre par eux-mêmes contre une concentration excessive en EOR. Nous allons donc maintenant nous intéresser à la génération, aux effets bénéfiques et toxiques, ainsi qu'au recyclage de ces EOR dans l'organisme et plus particulièrement dans l'épididyme, afin de mieux comprendre les processus physiologiques intervenant dans la maturation des spermatozoïdes.

II. Les effets des espèces oxygénées réactives sur la chromatine spermatique

1. La production des EOR

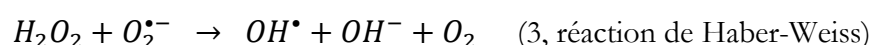
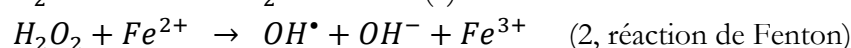
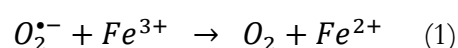
Les espèces oxygénées réactives sont des molécules issues du métabolisme aérobie des cellules. Ces molécules sont composées d'oxygène et comportent soit des électrons non appariés dans la couche de valence, soit une liaison instable entre deux atomes, ce qui les rend relativement réactives et leur confère un pouvoir oxydant. Il peut s'agir de molécules neutres, d'ions ou de radicaux.

Différents éléments cellulaires peuvent les générer. Le plus communément admis est la mitochondrie, *via* les complexes de la chaîne respiratoire. Mais d'autres sources possédant des enzymes de type oxydase ont également été répertoriées : le réticulum endoplasmique (cytochrome P450, diamine oxydase...), les peroxysomes (voie d'oxydation des acides gras), le cytosol (NO synthétase, lipoxygénases...), la membrane plasmique (NADPH oxydases, lipoxygénases...) et l'espace extracellulaire (xanthine oxydase). Les EOR peuvent également être produites en excès lors d'une exposition de l'organisme à différents stress exogènes et endogènes comme les radiations, les variations de température, les médicaments, le tabagisme, les infections, les maladies d'origine métabolique...

Les EOR étant des molécules instables et réactives, elles forment une cascade de réactions qui s'enchainent les unes après les autres, générant à chaque fois de nouvelles EOR (figure 41). Cette cascade commence généralement par la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) par ajout d'un électron à une molécule de dioxygène (O_2), par exemple, lors de la respiration cellulaire mitochondriale. L'anion superoxyde est donc considéré comme une EOR primaire capable de générer des EOR secondaires lorsqu'il interagit avec d'autres molécules. $O_2^{\bullet -}$ est une molécule chargée négativement qui ne peut pas traverser les membranes hydrophobes en dehors des transporteurs spécifiques. De plus, ce radical est très instable et est capable de dismuter spontanément en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Sa durée de vie est donc courte et son action est

localisée à son site de production. Ainsi, bien que $O_2^{\bullet-}$ soit faiblement réactif, les mitochondries y sont très exposées et disposent d'une enzyme, la superoxyde dismutase (SOD), capable de catalyser sa dismutation en H_2O_2 pour se prémunir d'une augmentation de sa concentration.

H_2O_2 est une EOR secondaire capable de traverser les membranes biologiques. Cette molécule peut ainsi avoir des effets à distance de son lieu de production, d'autant qu'elle est plus stable que $O_2^{\bullet-}$, lui permettant de parcourir de longs trajets. Elle est peu réactive avec les différentes molécules biologiques, à l'exception du site actif des enzymes peroxydases. Ce sont les produits des différentes transformations qu' H_2O_2 peut subir qui sont hautement réactifs et donc hautement toxiques. Ainsi, en présence de fortes concentrations en $O_2^{\bullet-}$ et d'ions métalliques (fer, cuivre, cobalt, titane), en particulier de fer dans le cas de certaines maladies (hémochromatose, hémodialyse, β -thalassémies), H_2O_2 peut permettre la formation du radical hydroxyle (OH^{\bullet}) selon la réaction en deux phases de Haber-Weiss :



Le radical OH^{\bullet} est extrêmement réactif et possède une demi-vie très courte. Dès sa formation, il va réagir avec n'importe quelle molécule de son environnement immédiat (lipide, protéine, ADN), ce qui le rend très toxique malgré son faible rayon d'action.

H_2O_2 peut également générer de puissants agents oxydants halogénés à base de chlore ($HOCl$, acide hypochloreux) ou de brome ($HOBr$, acide hypobromeux), qui jouent un rôle antimicrobien important. Ces réactions sont sous le contrôle d'enzymes peroxydases présentes dans les cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes...).

Parmi les molécules oxydantes réactives, certaines comportent de l'azote. Elles sont dérivées du monoxyde d'azote (NO^{\bullet}). Le NO^{\bullet} est une petite molécule synthétisée naturellement par l'organisme à partir d'arginine et de dioxygène *via* une enzyme, l'oxyde nitrique synthase (*nitric oxide synthase* ou NOS). NO^{\bullet} peut diffuser librement à travers les membranes biologiques et est relativement stable. Il peut réagir avec $O_2^{\bullet-}$ pour former le peroxynitrite ($ONOO^-$) qui est plus réactif. Cette réaction se produit uniquement en cas de fortes concentrations des deux réactifs, lors d'un stress oxydant important.

2. Les effets des EOR lors de la maturation des spermatozoïdes

Les EOR sont donc des molécules qui sont pour la plupart très réactives avec les différents composants cellulaires. Elles jouent des rôles physiologiques indispensables au dialogue intercellulaire, à la protection immunitaire, au maintien de l'homéostasie en dioxygène, à la régulation de l'apoptose... Selon leur réactivité et leur capacité à traverser ou non les membranes biologiques, elles vont pouvoir agir à plus ou moins grande distance de leur lieu de synthèse dans différents processus biologiques. Mais leur haute réactivité est aussi ce qui peut les rendre nocives pour l'organisme. En effet, en trop forte concentration, les EOR réagissent trop vite avec les

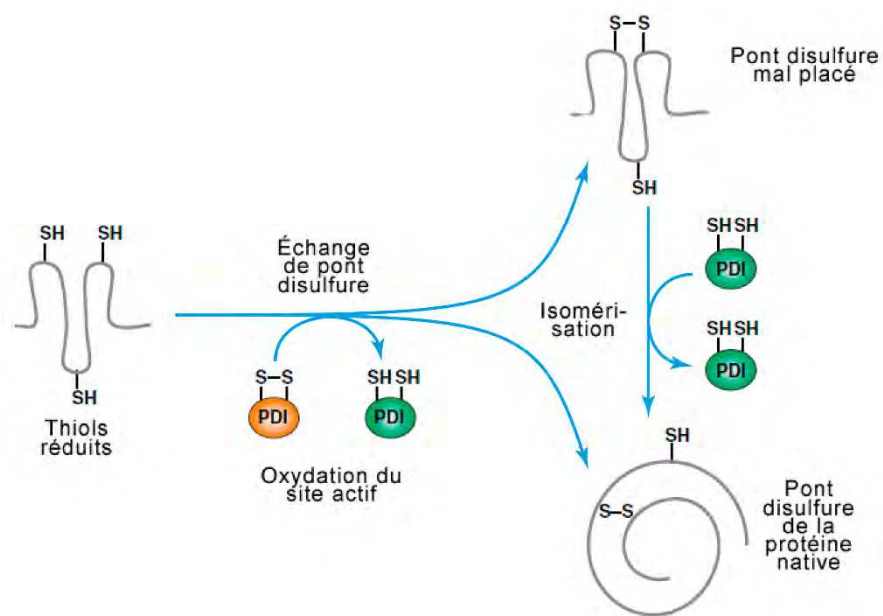


Figure 42 : La formation de ponts disulfures par la Protéine Disulfide Isomérase au sein des protéines

(Bulleid & Ellgaard, 2011)

différents éléments cellulaires, bien avant d'être éliminées ou d'avoir atteint leurs cibles physiologiques. Des cascades de réactions chimiques se produisent alors, entraînant de nombreux dommages aux différents compartiments cellulaires, suivis d'une mort cellulaire. Nous allons maintenant décrire la dualité de l'action des EOR, en particulier dans le domaine de la maturation des spermatozoïdes.

a. Des acteurs indispensables de la maturation spermatique

➤ *La participation des EOR au pontage disulfure*

Lors de la maturation spermatique, les EOR participent aux réactions de maturation post-transcriptionnelle des protéines composant les spermatozoïdes ou présentes dans le fluide qui les entoure. Elles interviennent lors de la réalisation de ponts disulfures ($-S-S-$) dans ou entre les chaînes polypeptidiques. La formation d'un pont disulfure consiste à lier de façon covalente deux résidus cystéines *via* leur groupement thiol ($-SH$) présent sur leur chaîne latérale. La formation de ponts disulfures permet de stabiliser la conformation spatiale tertiaire ou quaternaire d'une protéine lors de son repliement. Cette modification post-traductionnelle est donc indispensable à l'acquisition de la fonction de la protéine qu'elle soit structurale, enzymatique...

Cette réaction d'oxydation des thiols peut être enzymatique ou non. Les enzymes qui contrôlent la formation des ponts disulfures ont une activité thiol peroxydase et celles qui peuvent relocaliser ces pontages ont une activité disulfide isomérase (figure 42), ces deux activités pouvant être effectuées par une même enzyme comme dans le cas de la protéine disulfure isomérase (PDI/Pdia1). Ces enzymes possèdent toutes au moins un domaine thiorédoxine, composé d'une suite de feuillets β et d'hélices α , leur conférant leur activité enzymatique thiol peroxydase. Ces enzymes possèdent dans leur site actif des cystéines séparées par deux résidus ($-Cys-X-X-Cys-$) formant un pont disulfure qui sera transféré sur la protéine cible (activité thiol peroxydase). Dans le cas de l'activité disulfide isomérase, les cystéines du site actif de l'enzyme sont libres : le pont disulfure mal placé sur la protéine cible est transféré dans le site actif de l'enzyme, avant que celle-ci ne le transfère à nouveau à un autre endroit de la protéine cible, permettant le repliement correct de celle-ci. Ces enzymes ont surtout été étudiées dans le cadre de leur action de chaperonnage du repliement des protéines au sein du réticulum endoplasmique. Cependant, la formation des ponts disulfures peut également être réalisée dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, dans le cytoplasme, dans le noyau et à l'extérieur de la cellule.

Dans ces mécanismes, les EOR interviennent soit directement dans l'oxydation en un pont disulfure de deux cystéines physiquement proches, soit dans l'oxydation des cystéines du site actif des enzymes à activité thiol peroxydase. L'oxydation directe des cystéines par les EOR seules est une réaction lente dans des conditions physiologiques normales, ce qui n'est par exemple pas toujours le cas au sein du site catalytique des enzymes. Elles peuvent également être utilisées comme substrat par certaines enzymes chargées de réaliser des ponts disulfures, telles que certaines glutathion peroxydases (GPx4, GPx7, GPx8 chez les mammifères).

La mesure du contenu en thiols libres ($-SH$) par rapport au contenu total en soufre dans les spermatozoïdes de rat à différents stades de leur maturation montre que leur proportion est de plus de 90 % dans le testicule, de 75 % dans la tête de l'épididyme et de 25 % dans la queue de

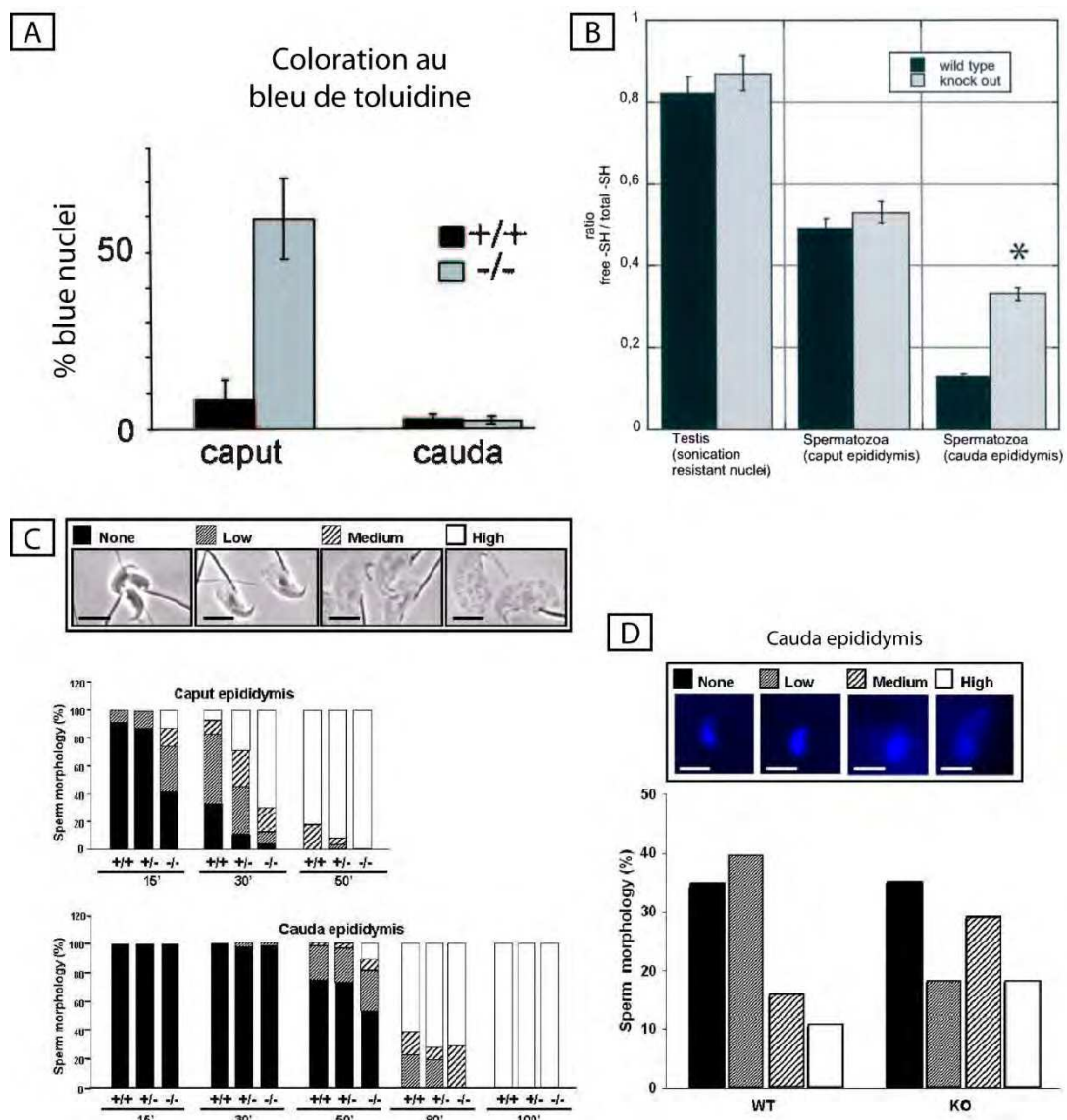


Figure 43 : Le phénotype des souris *sngpx4*^{-/-}

Les souris *sngpx4*^{-/-} présentent un défaut de condensation de la chromatine spermatique. Ce défaut est visible par coloration du noyau spermatique au bleu de toluidine (A), cependant, cette coloration ne décèle aucune variation dans le noyau des spermatozoïdes *sngpx4*^{-/-} dans la queue de l'épididyme par rapport aux spermatozoïdes sauvages. Néanmoins, l'utilisation de monobromobimane, qui fluorescence en réagissant avec les thiols libres, indique une diminution de l'activité de pontage disulfure dans les spermatozoïdes lors du transit épидидymaire chez les souris *sngpx4*^{-/-} par rapport aux souris sauvages (B) (Conrad *et al.*, 2005). L'analyse *in vitro* de la décondensation des spermatozoïdes provenant de la queue de l'épididyme, par incubation avec du glutathion et de l'héparine (C, après capacitation, incubation de 15, 30, 60, 80 ou 100 minutes) ou par fécondation d'ovocytes dépellucidés (D, observation 1h après le mélange des gamètes mâles et femelles), a permis de mettre en évidence la fragilité de la structure de la chromatine spermatique chez les souris *sngpx4*^{-/-} (Puglisi *et al.*, 2012).

l'épididyme, le canal déférent et l'éjaculat (Shalgi *et al.*, 1989). Le pontage disulfure est donc un mécanisme important à l'œuvre lors de la maturation des gamètes.

Dans le cas du noyau spermatique, la protéine snGPx4 qui est liée à la matrice nucléaire spermatique (Puglisi *et al.*, 2012) semble être nécessaire au bon déroulement des opérations de pontage disulfure entre les protamines lors de la spermiogenèse et du transit épидидymaire, permettant la condensation accrue de la chromatine spermatique (Pfeifer *et al.*, 2001 ; Conrad *et al.*, 2005 ; Noblanc *et al.*, 2012). Cette isoforme nucléaire de GPx4 est une protéine monomérique de 34 kDa, possédant une séquence de localisation nucléaire dans la partie amino-terminale ainsi qu'un domaine riche en arginine (Pfeifer *et al.*, 2001). Lors du transit épидидymaire, la partie amino-terminale de deux-tiers des protéines est clivée et snGPx4 est alors présente sous différentes formes de 20, 22 et 24 kDa. Que ce soit sous sa forme de 34 kDa ou clivée, snGPx4 possède une activité enzymatique lui permettant de réduire différentes EOR de type peroxyde : H_2O_2 , les phospholipides peroxydés, l'hydroperoxyde de *tert*-butyle (substrat synthétique) (Pfeifer *et al.*, 2001). Elle est exprimée presque exclusivement dans les testicules à partir du même gène que les isoformes cytosolique et mitochondriale. La transcription d'un exon alternatif à la place du premier exon permet de produire un ARNm spécifique de l'isoforme nucléaire. L'invalidation constitutive de cette isoforme chez la souris a été réalisée par l'insertion du gène eGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) au sein de l'exon alternatif, pour ne pas modifier l'expression des isoformes cytosolique et mitochondriale (Conrad *et al.*, 2005). Les premières études réalisées sur ces souris (Conrad *et al.*, 2005) ont montré qu'elles étaient parfaitement viables et ne présentaient ni phénotype d'infertilité chez le mâle, ni de modifications des tissus testiculaires et épидидymaire, ni de variations des paramètres spermatiques tels que la numération, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes. Cependant, l'analyse plus poussée de la chromatine spermatique par utilisation de colorants s'insérant dans l'ADN a mis en évidence un retard de condensation de la chromatine des spermatozoïdes présents dans la tête de l'épididyme, qui n'est pas retrouvé pour les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme (figure 43A). L'utilisation de monobromobrimane (mBrB), une molécule qui fluoresce lorsqu'elle réagit avec des groupements thiols libres, a permis de montrer la diminution de l'activité de pontage disulfure dans la tête des spermatozoïdes transitant dans l'épididyme de ces souris *sngpx4*^{-/-} (figure 43B). Ces résultats sont en accord avec les données obtenues *in vitro* et *in vivo* chez le rat, démontrant l'activité enzymatique thiol peroxydase de snGPx4 dans le pontage disulfure intra- et inter-protamines (Pfeifer *et al.*, 2001). Plus récemment, chez ce même modèle de souris, une étude italienne a confirmé l'importance du rôle joué par snGPx4 dans la condensation de la chromatine spermatique en soumettant les spermatozoïdes de ces souris à une décondensation *in vitro*, soit par l'action conjuguée de l'héparine et du glutathion (figure 43C), soit par injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) dans des ovocytes de souris sauvages (figure 43D) (Puglisi *et al.*, 2012). L'analyse des cinétiques de décondensation de la chromatine spermatique a montré que la décondensation de la chromatine des spermatozoïdes *sngpx4*^{-/-} est plus rapide que celle des spermatozoïdes sauvages, ce qui dénote une instabilité plus importante de la chromatine chez les gamètes dépourvus de snGPx4. La même équipe de recherche a démontré un phénotype d'infertilité masculine dans ce modèle de souris (Pipolo *et al.*, 2012). Le croisement de souris mâles *sngpx4*^{-/-} avec des souris femelles sauvages en monte naturelle provoque moins de gestations et des portées de tailles moins importantes que le croisement de couples de souris sauvages. Des expériences de fécondation *in vitro* ont montré une diminution de 70 % du pourcentage de zygotes (stade des *pronuclei*) obtenus par insémination d'ovocytes sauvages par des

spermatozoïdes *sngpx4*^{-/-} capacités comparé à celle par des spermatozoïdes sauvages. De précédentes données ayant montré une association de snGPx4 avec la matrice de l'acrosome (Puglisi *et al.*, 2012), certaines étapes de la fécondation ont été analysées plus en détail. Les tests de liaison et de fusion à la membrane plasmique de l'ovocyte sauvage ne montrant aucune différence entre les spermatozoïdes *sngpx4*^{-/-} et sauvages, l'équipe de C. Boitani en a déduit que cette infertilité des souris mâles *sngpx4*^{-/-} serait due à une incapacité des spermatozoïdes à traverser la zone pellucide entourant l'ovocyte.

D'autres formations de ponts disulfures ont été remarquées dans le flagelle des gamètes et plus particulièrement dans la pièce intermédiaire. Les mitochondries, qui forment une chaîne enroulée en hélice autour de l'axonème et des fibres denses, sont maintenues ensembles dans cette position par une matrice protéique. Cette matrice, la capsule mitochondriale, lie les mitochondries aux fibres denses externes et assure le maintien structural de la pièce intermédiaire du flagelle. La capsule mitochondriale est formée d'un ensemble de protéines (kératines, *sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein* [SMCP]...) associées entre-elles par de nombreux ponts disulfures. Une autre isoforme de GPx4, la forme mitochondriale (mGPx4), intervient dans la formation de ces liaisons entre protéines. Cette protéine, mise en place lors de la spermiogenèse dans la membrane mitochondriale externe, semble réaliser des pontages entre elle-même et les fibres denses. Elle perdrait alors son activité enzymatique et deviendrait une protéine de structure du flagelle (Ursini *et al.*, 1999 ; Maiorino *et al.*, 2005). Les souris invalidées pour la forme mitochondriale de GPx4 sont viables mais infertiles, en raison de problèmes de mobilité des spermatozoïdes (anomalies structurales de la pièce intermédiaire du flagelle, cassure au niveau du cou des spermatozoïdes...) (Schneider *et al.*, 2009). Ces anomalies de la pièce intermédiaire sont aussi associées à une augmentation de la concentration en thiols libres, synonyme d'une diminution de l'activité de pontage disulfure, ce qui confirme le rôle enzymatique de mGPx4.

L'acrosome est également un lieu présentant de nombreux ponts disulfures. La matrice acrosomique serait structurée et maintenue, entre autres, par des ponts disulfures entre ses composants. Cette matrice jouerait un rôle important dans le bon déroulement des événements lors de la fécondation. D'autre part, l'activité disulfide isomérase est directement impliquée dans la fécondation. Certaines protéines à activité disulfide isomérase (PDI/Pdia1, Pdia3, Pdia4, Pdia6) sont situées sur la membrane interne de l'acrosome des spermatides de souris (Ellerman *et al.*, 2006). L'inhibition de leur activité enzymatique par différentes molécules réduit significativement et de façon dose-dépendante le taux de fécondation lors de tests de fusion spermatozoïde/ovocyte *in vitro*. Une analyse approfondie a permis de déterminer que Pdia3 est la protéine disulfide isomérase impliquée dans ce mécanisme de fusion des gamètes lors de la fécondation, mais il n'est pas exclu que d'autres protéines possédant la même activité disulfide isomérase soient impliquées. Pdia3 modifierait la conformation spatiale d'une ou plusieurs protéines situées sur la membrane interne de l'acrosome du spermatozoïde, permettant son association et/ou sa reconnaissance par l'ovocyte. Cependant, à l'heure actuelle, les protéines directement impliquées dans ce processus et susceptibles d'être le substrat de Pdia3 sont encore inconnues.

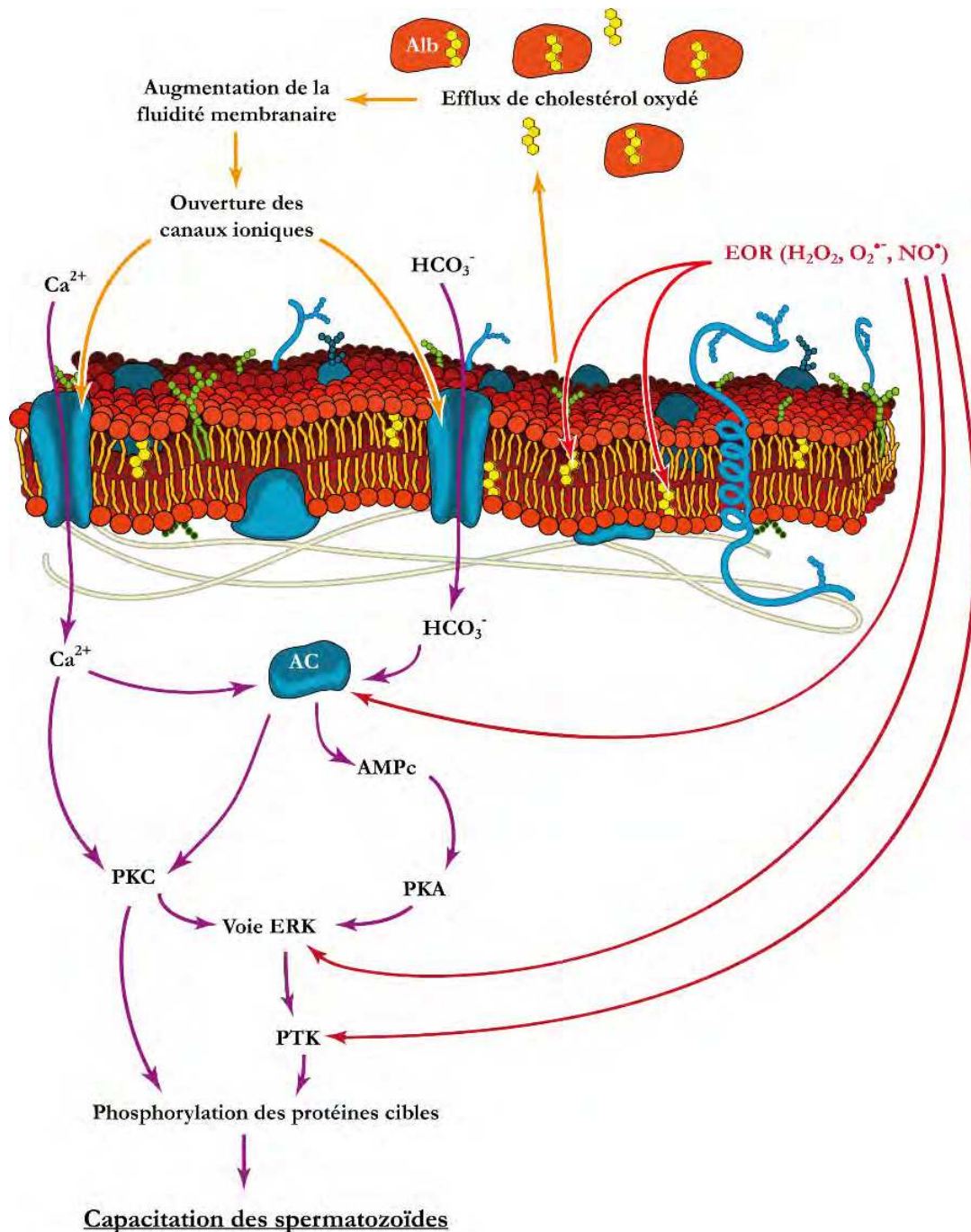


Figure 44 : Le rôle des EOR dans les mécanismes de capacitation

La capacitation est un ensemble de modifications permettant de préparer les spermatozoïdes à la réaction acrosomique et à la fécondation. L'oxydation du cholestérol membranaire par les EOR facilite son efflux, permettant d'augmenter la fluidité membranaire. Ce phénomène autorise l'ouverture de canaux de transport, ce qui va provoquer un influx de Ca^{2+} et de bicarbonate (HCO_3^-). L'augmentation de la concentration intracellulaire de ces ions est à l'origine de l'activation de différentes voies de signalisation impliquées dans la phosphorylation de protéines et dans l'augmentation de la production d'EOR. Ces dernières sont par ailleurs capables d'activer ces mêmes voies de signalisation. AC : adénylate cyclase ; Alb : albumine ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; ERK : *Extracellular signal-regulated kinases* ; PKA : protéine kinase A ; PKC : protéine kinase C ; PTK : protéine tyrosine kinase.

➤ *Des messagers des voies de transduction*

Les EOR peuvent également intervenir dans la signalisation cellulaire en tant que second messager. Deux principaux événements de la vie du spermatozoïde sont en partie contrôlés par les EOR : la capacitation et la réaction acrosomique. Il s'agit de deux étapes indispensables de la maturation des spermatozoïdes se produisant dans le tractus génital femelle en vue de permettre la fécondation.

• La capacitation

La capacitation est un ensemble complexe et finement régulé de modifications du spermatozoïde, qui se déroulent tout au long du trajet de plusieurs heures dans le tractus femelle et sont réversibles. Ces modifications comprennent une augmentation de la fluidité membranaire, une augmentation intracellulaire du pH et de la concentration en AMPc et en Ca^{2+} , une augmentation de la production d'EOR et une induction de différentes cascades de transduction conduisant à une forte activité de phosphorylation sur de nombreuses protéines. L'ensemble de ces changements prépare le spermatozoïde à la réaction acrosomique et provoque une hyperactivité des mouvements du flagelle. L'hyperactivation du spermatozoïde est caractérisée par des mouvements spermatiques très rapides, peu linéaires et de forte amplitude qui vont permettre au gamète de se détacher de l'épithélium de l'oviducte et de se déplacer à travers le milieu très visqueux du tractus génital femelle.

L'inhibition des enzymes produisant des EOR (NOS) et l'ajout d'enzymes éliminant les EOR (SOD, catalase) produisent un blocage de la capacitation. À l'inverse, l'ajout d'EOR exogènes ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , NO^{\bullet}) promeut la capacitation en entraînant une augmentation de la phosphorylation des protéines spermatiques (de Lamirande & O'Flaherty, 2008). L'action inductrice de la capacitation de ces EOR se ferait par l'activation de différentes cascades de phosphorylation (figure 44).

Ainsi, les EOR sont par exemple capables d'activer l'adénylate cyclase (AC). Chez le spermatozoïde, cette enzyme est principalement située dans la pièce intermédiaire du flagelle sous sa forme soluble qui peut être activée par le Ca^{2+} , le bicarbonate et H_2O_2 . L'ajout de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et de NO^{\bullet} l'induit également. L'AC activée va alors catalyser la transformation de l'ATP en AMPc. L'augmentation de la concentration en AMPc, caractéristique du processus de capacitation, va permettre de décrocher les deux sous-unités régulatrices de la protéine kinase A (PKA). Les deux sous-unités catalytiques libres de la PKA seront alors actives et pourront ensuite phosphoryler les résidus thréonine et sérine présents dans le motif suivant : $-\text{Arg}-\text{X}-\text{X}-[\text{Ser} ; \text{Thr}]-$ (de Lamirande & O'Flaherty, 2008, 2012).

Les EOR permettent également d'activer la voie de signalisation ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*), composée d'une cascade de phosphorylations sur des protéines de la famille des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*). Cette voie des ERK peut être induite par l'activation de différentes autres voies qui convergent toutes vers la phosphorylation activatrice des protéines ERK. Ainsi, les EOR agissent à la fois sur PTK (*protein tyrosine kinase*), PKC (*protein kinase C*), Ras... L'activation subséquente des kinases ERK et ERK-like va leur permettre de phosphoryler les sérine et thréonines du motif suivant : $-\text{Pro}-\text{X}-\text{X}-[\text{Ser} ; \text{Thr}]-\text{Pro}-$ (de Lamirande & O'Flaherty, 2008, 2012).

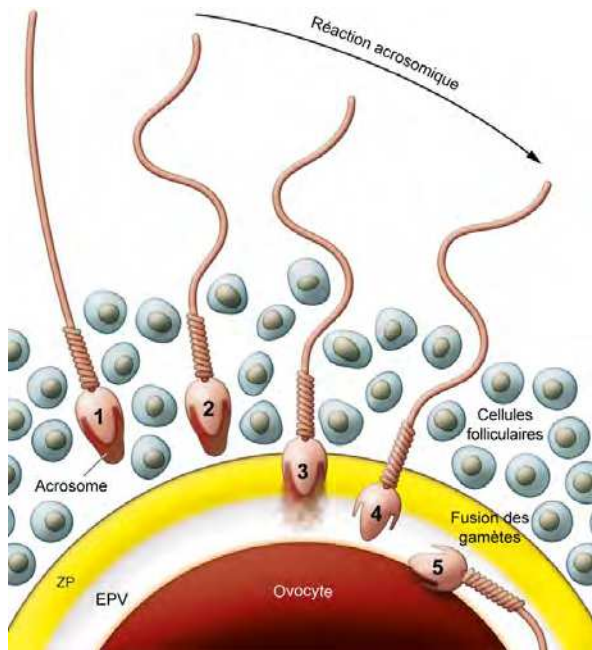


Figure 45 : La réaction acrosomique

La réaction acrosomique se produit après la traversée de la couronne de cellules folliculaires (1), au moment où les protéines de la membrane à la surface de l'acrosome reconnaissent les glycoprotéines de la zone pellucide (ZP) (2). Cette reconnaissance provoque la libération des enzymes lytiques contenues dans l'acrosome qui vont digérer la ZP (3) et permettre au spermatozoïde de la traverser pour atteindre l'espace péri-vitellin (EPV) (4), où il pourra fusionner avec l'ovocyte (5) (Ikawa *et al.*, 2010).

Résidus	Produits
Phénylalanine	2,3-dihydroxyphénylalanine, 2-, 3-, et 4-hydroxyphénylalanine
Tyrosine	3,4-dihydroxyphénylalanine, 3-nitrotyrosine, chlorotyrosine, dityrosine
Tryptophane	kynurénine, 3hydroxykynurénine, oxindole, hydropyrroloindole, N-formyl-kynurénine
Histidine	2-oxohistidine, 4-OH-glutamate, aspartate, asparagine
Lysine	acide 2-aminoadipique-6-semialdéhyde
Arginine	acide glutamique-5-semialdéhyde
Proline	acide glutamique-5-semialdéhyde
Thréonine	acide 2-amino-3-cétobutyrique
Acide glutamique	acide pyruvique
Acide aspartique	acide pyruvique
Cystéine	nitrosothiols, radicals thiol, cystine, composés conjugués avec le glutathion
Méthione	méthionine sulfoxyde, méthionine sulfone

Tableau 2 : Les produits de l'oxydation des résidus composant les protéines

(Lushchak, 2007)

- La réaction acrosomique

Par la suite, les spermatozoïdes qui réussissent à rejoindre l'ovocyte dans l'ampoule de la trompe de Fallope vont subir de nouvelles modifications aussi complexes et semblables aux précédentes : c'est la réaction acrosomique. L'évènement majeur de cette réaction est la fusion de la membrane externe de l'acrosome avec la membrane plasmique, libérant des enzymes hydrolytiques, qui vont digérer la zone pellucide entourant l'ovocyte afin que le spermatozoïde puisse la traverser (figure 45), et découvrant des récepteurs de la membrane interne de l'acrosome impliqués dans la reconnaissance de l'ovocyte et la fusion des gamètes. Cette perte de l'acrosome s'accompagne d'un influx de Ca^{2+} qui va activer la phospholipase C, menant au clivage de PIP2 puis à la libération des réserves spermatiques de Ca^{2+} et à une vague de phosphorylations de différentes protéines par la PKC.

La réaction acrosomique, tout comme la capacitation, peut être induite par l'ajout d'EOR exogènes ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , NO^{\bullet}) et bloquée par l'inhibition des enzymes productrices d'EOR (NOS) ou l'ajout simultané de SOD et de la catalase. Cependant, les mécanismes d'action des EOR ne sont pas connus et sont très probablement différents de ceux présents lors de la capacitation (de Lamirande & O'Flaherty, 2012).

➤ ***L'induction de la capacitation via la peroxydation des stérols***

Comme nous venons de le voir, l'une des voies importantes d'induction de la capacitation des spermatozoïdes nécessite l'activation de la forme soluble de l'adénylate cyclase (AC). Cette activation de l'AC est liée à la perte importante des stérols (desmostérol et cholestérol) composant la membrane spermatique. En effet, ceux-ci sont captés par des protéines acceptrices telles que l'albumine. L'absence de ces stérols rend la membrane plus fluide. Ceci favorise la réaction acrosomique et la fusion des gamètes. L'augmentation de la fluidité membranaire permet aussi l'ouverture de canaux ioniques et donc l'entrée massive de Ca^{2+} dans les spermatozoïdes. Cette forte augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} induit l'activation de l'AC et provoque donc les phénomènes de phosphorylation des protéines indispensables à la maturation gamétique. Il a été récemment découvert sur des spermatozoïdes bovins que les EOR sont impliquées dans le retrait des stérols de la membrane spermatique lors de la capacitation (Silva, 2006 ; Brouwers *et al.*, 2011). Les radicaux sont connus pour déclencher une oxydation des lipides présentant des doubles liaisons (ou insaturations) comme sur les stérols par exemple. Ainsi, les stérols de la membrane des spermatozoïdes, en particulier le cholestérol, sont naturellement oxydés en oxystérols sous l'action des EOR générés lors de la capacitation. La formation d'un groupement hydroxyle hydrophile sur ces molécules hydrophobes entraîne peut-être une moins bonne interaction du cholestérol avec la bicouche lipidique, facilitant sa sortie de la membrane plasmique et son interaction avec les protéines acceptrices (figure 44). Cette hypothèse est appuyée par le fait que des spermatozoïdes ayant été soumis à un cycle de congélation/décongélation ne présentent pas de formation d'oxystérols supplémentaires après incubation avec de l'hydroperoxyde de tert-butyle et ne présentent aucune perte des stérols après une induction *in vitro* de la capacitation en présence d'albumine (Brouwers *et al.*, 2011).

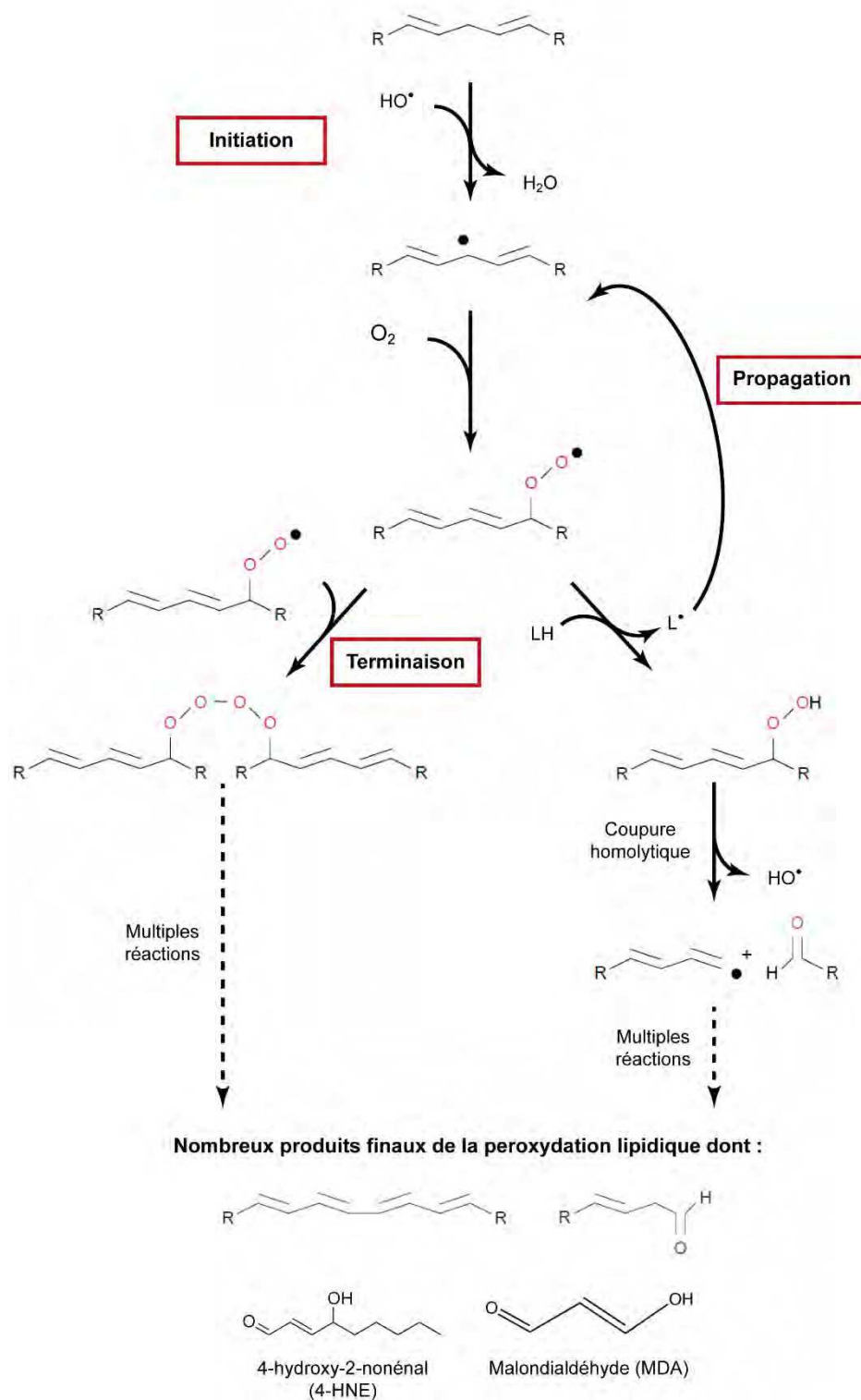


Figure 46 : Le mécanisme de la peroxydation des lipides

L'initiation de la réaction en chaîne consiste à enlever un atome d'hydrogène à un carbone situé entre deux insaturations conjuguées, formant alors un radical lipidique alkyle (L^\bullet). Ce radical va alors réagir avec du dioxygène pour former un radical lipidique peroxy (LOO^\bullet). LOO^\bullet est instable et va arracher un atome d'hydrogène à un autre lipide à proximité pour former un lipide peroxydé (LOOH). Le lipide perdant un hydrogène devient alors un radical alkyle (L^\bullet) à son tour et va lui aussi réagir avec l' O_2 et les lipides voisins : il s'agit de l'étape de propagation de la peroxydation lipidique. Pour mettre fin à cette enchaînement de réactions, les radicaux formés doivent réagir entre eux ou avec d'autres molécules biologiques telles que des molécules antioxydantes. Cependant, les lipides peroxydés formés ne sont pas stables et de nombreuses autres réactions vont conduire à la formation de différents composés, dont certains sont très toxiques (MDA, 4-HNE, aldéhydes...).

b. Des molécules particulièrement nocives pour les spermatozoïdes

Les EOR n'ont pas que des effets physiologiques positifs pour la maturation spermatique, ce sont également des molécules très réactives avec de nombreuses biomolécules composant les cellules. Si une EOR réagit avec un composant cellulaire avant d'être éliminée par des molécules antioxydantes, elle risque alors de causer des dommages irréversibles à la cellule. En cas de trop forte concentration d'EOR et donc de stress oxydant, l'accumulation de ces dommages peut même conduire à la mort de la cellule par apoptose. Nous allons maintenant nous intéresser aux dommages susceptibles d'être causés par les EOR dans les spermatozoïdes.

➤ *L'oxydation des protéines*

Nous avons vu jusqu'ici que les EOR interviennent dans le pontage disulfure des chaînes polypeptidiques de façon à assurer leur repliement dans une conformation adéquate, assurant leur fonctionnalité enzymatique ou structurelle. Elles sont également capables de réguler l'activité enzymatique d'une protéine en agissant comme un second messenger, par exemple lors de la capacitation des spermatozoïdes. Cependant, les EOR peuvent aussi endommager les protéines et les rendre moins actives, voire non-fonctionnelles, par différentes réactions entraînant une modification de leur conformation spatiale et de leurs propriétés physico-chimiques.

Les chaînes latérales de tous les acides aminés peuvent réagir avec les EOR, bien que celles contenant un cycle aromatique (phénylalanine, tryptophane, tyrosine), du soufre (cystéine, méthionine) ou du sélénium (sélénocystéine) soient plus susceptibles de réaliser ce type de réactions (tableau 2). Par ailleurs, OH^\bullet peut réagir avec le carbone α à la base de la chaîne latérale. Cette réaction enlève l'atome d'hydrogène associé à ce carbone, produisant un radical alkyle. La protéine alors sous forme de radical peut s'associer à une autre protéine ayant subi cette même réaction ou à un lipide peroxydé, subir un clivage de la liaison peptidique ou former un groupement hydroxyle ou carbonyle sur le carbone α .

➤ *La peroxydation lipidique*

Les EOR réagissent aussi avec les lipides, en particulier ceux présentant des doubles liaisons ou insaturations. Les principales cibles de cette peroxydation des lipides sont donc les acides gras polyinsaturés libres, associés à des lipoprotéines ou sous formes de phospholipides, et les stérols. La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne qui, une fois initiée, va produire différents produits intermédiaires lors des différentes étapes, avant qu'elle ne soit terminée par association de deux radicaux en une molécule plus stable (figure 46). L'initiation de la réaction est généralement réalisée par OH^\bullet , OOH^\bullet et les radicaux lipidiques (LO^\bullet et LOO^\bullet). Malgré l'étape de terminaison de la réaction, en présence des formes ioniques des métaux de transition comme le fer ou le cuivre, les lipides peroxydés peuvent générer de nouveaux radicaux lipidiques (LO^\bullet ou LOO^\bullet) qui seront alors à l'origine d'une reprise des réactions de peroxydation des lipides.

Les lipides peroxydés formés par l'action des EOR sont instables et vont alors être dégradés. Cette dégradation génère des alcanes (chaînes carbonées saturées), des aldéhydes ($\text{R}-\text{CHO}$) et des acides par rupture des liaisons covalentes. Les aldéhydes en particulier sont connus pour leur toxicité. Ils peuvent réagir avec de nombreuses molécules biologiques comportant un groupement amine ($-\text{NH}_2$), thiol ($-\text{SH}$) ou carbonyle ($-\text{CO}$), formant des adduits sur les protéines,

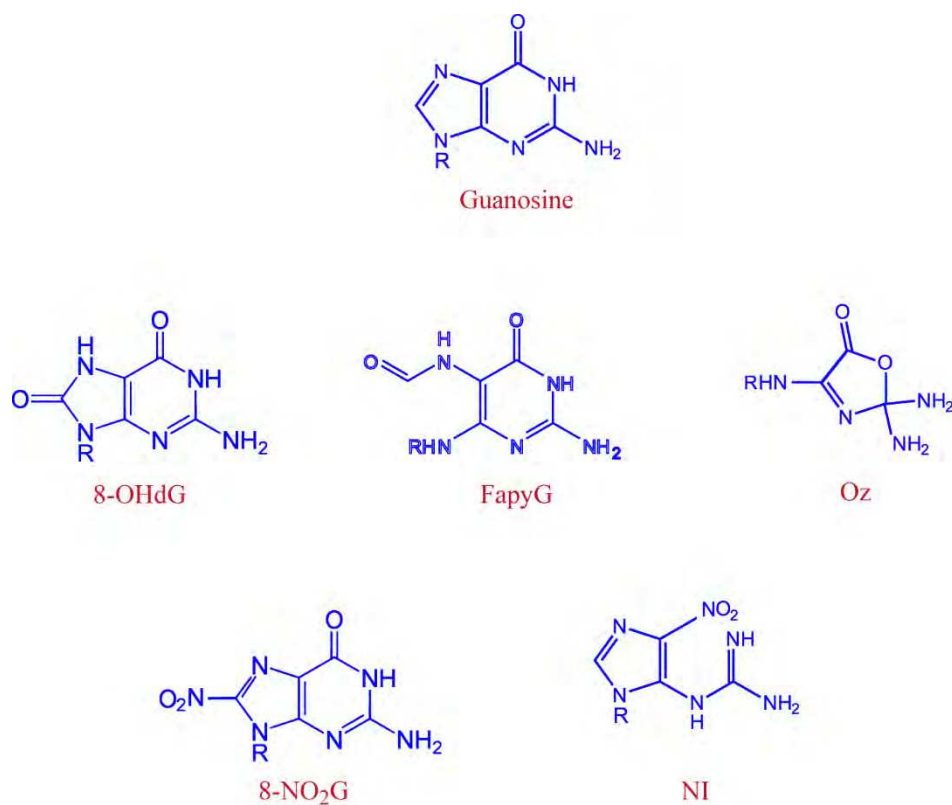


Figure 47 : La guanosine et ses différents produits d'oxydation

Le 7,8-dihydro-8-oxo-2'-déoxyguanosine (8-OHdG), le 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamido-pyrimidine (FapyG), l'oxazolone (Oz) ou certains dérivés nitrés comme le 8-nitroguanine (8-NO₂G) et le 5-nitro-guanidino hydantoïne (NI) sont des produits de l'oxydation de la guanosine.

les lipides et l'ADN. Ces composés dus à la peroxydation lipidique peuvent générer des dommages dans tous les compartiments cellulaires. Le 4-hydroxy-2-nonéanal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA) sont deux de ces molécules toxiques qui sont souvent utilisées comme marqueurs de la peroxydation lipidique (figure 46).

Les spermatozoïdes sont particulièrement sensibles à la peroxydation lipidique car leur membrane est enrichie en acides gras polyinsaturés et en stérols, surtout après leur maturation durant le trajet dans l'épididyme. Ainsi, le traitement de spermatozoïdes humains par des molécules et enzymes augmentant la concentration en EOR dans le milieu d'incubation entraîne une augmentation de la peroxydation lipidique (MDA + 4-hydroxy-alkénals) et une perte de leur mobilité (Gomez *et al.*, 1998). La peroxydation lipidique des membranes spermatiques provoque une augmentation de leur rigidité, ce qui, associé aux dommages des protéines par les produits de dégradation, peut générer une perte de fonction des protéines membranaires (enzymes, récepteurs) et gravement altérer les processus de capacitation, de réaction acrosomique ou de fusion des gamètes.

➤ *L'oxydation de l'ADN*

Les EOR sont également capable d'endommager l'ADN. Il s'agit d'ailleurs d'un point crucial en termes de fertilité, puisque le bon déroulement du développement embryonnaire et la bonne santé du futur individu repose sur le fait que le patrimoine génétique parental transmis soit exempt d'erreurs et de modifications. Or, les dommages pouvant résulter de l'action des EOR sur l'ADN sont nombreux. En effet, les bases azotées peuvent être modifiées, des liaisons covalentes inter-, intra-brins et avec les protéines chromatinienne peuvent être mises en place et des cassures de l'ADN peuvent survenir (Jena, 2012). Ainsi, l'oxydation des bases azotées de l'ADN est à l'origine de nombreuses bases modifiées. Les EOR peuvent réagir avec toutes les bases (A, T, G, C) bien que la guanine soit leur cible privilégiée du fait de son plus faible potentiel d'oxydoréduction (plus fort pouvoir réducteur). Les EOR capables de modifier les bases azotées sont les plus réactives, telles que l' OH^\bullet , OHCl , OHBr , ONOO^- et ses dérivés. Ils agissent en arrachant un atome d'hydrogène à une base, formant un radical qui pourra subir différentes autres étapes de réaction en fonction de son environnement chimique, jusqu'à former une molécule stable. Le produit le plus fréquent de l'oxydation de la guanine est le 7,8-dihydro-8-oxo-2'-déoxyguanosine (8-OHdG), bien qu'il existe d'autres forme de guanine oxydée : le 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamido-pyrimidine (FapyG), l'oxazolone (Oz) ou certains dérivés nitrés comme le 8-nitroguanine (8- NO_2G) et le 5-nitro-guanidino hydantoïne (NI) (figure 47) (Jena, 2012).

Les liaisons covalentes entre les brins d'ADN ou entre deux bases azotées d'un même brin peuvent être réalisées par les EOR et les rayons UV. Ainsi, des liaisons entre une thymine et une guanine ou une adénine voisine ont pu être observées au sein d'un même brin, de même que des liaisons entre une guanine et une cytosine, en particulier au niveau des îlots CpG méthylés. Entre deux brins complémentaires, ce sont des liaisons entre deux guanines qui sont retrouvées dans les îlots CpG. De plus, des liaisons entre une base azotée et un sucre peuvent être observées intra- ou inter-brin. Ces liaisons seraient dues à une attaque des EOR sur les sucres formant le squelette de l'ADN.

Les liaisons covalentes entre l'ADN et une protéine sont réalisées entre un acide aminé et une base azotée ou un sucre de l'ADN, par exemple entre une lysine et une guanine.

Diagnostic	Ensemble des patients (n=12 945)	Patients azoospermiques (n=1 446)
Tous	100	11,2
Infertilité de cause (possible) connue	42,6	42,6
Cryptorchidie	8,4	17,2
Varicocèles	14,8	10,9
Anticorps anti-spermatozoïdes	3,9	–
Tumeur testiculaire	1,2	2,8
Autres	5,0	1,2
Infertilité idiopathique	30	13,3
Hypogonadisme	10,1	16,4
Synd. de Klinefelter (47,XXY)	2,6	13,7
Synd. de la Chapelle (XX)	0,1	0,6
Hypogonadisme primaire de cause inconnue	2,3	0,8
Hypogonadisme secondaire (hyponadotrophique)	1,6	1,9
Synd. de Kallmann	0,3	0,5
Hypogonadisme hyponadotrophique idiopathique	0,4	0,4
Dû à une chirurgie pituitaire	< 0,1	0,3
Autres	0,8	0,8
Hypogonadisme d'apparition tardive	2,2	–
Retard pubertaire constitutionnel	1,4	–
Maladie systémique	2,2	0,5
Cryopréservation en cas de maladie maligne	7,5	12,5
Tumeur testiculaire	5	4,3
Lymphome	1,5	4,6
Leucémie	0,7	2,2
Sarcome	0,6	0,9
Problème d'érection/éjaculation	2,4	–
Obstruction	2,2	10,3
Vasectomie	0,9	5,3
Mucoviscidose	0,5	3,1
Autres	0,8	1,9
Gynécomastie	1,5	0,2
Délétion sur le chromosome Y	0,3	1,6
Autres aberrations chromosomiques	0,2	1,3

Tableau 3 : Les causes et les facteurs associés à l'infertilité masculine chez les patients

Les données sont indiquées en pourcentage (Jungwirth *et al.*, 2012).

Ces différentes lésions de l'ADN, que ce soient des bases modifiées ou des liaisons covalentes anormales, peuvent entraîner une modification de la conformation du filament d'ADN et bloquer les processus de réplication et de transcription. Ainsi, ces dommages sont potentiellement létaux pour la cellule et doivent donc être réparés. Selon le type de lésion, le mécanisme de réparation utilisé par la cellule ne sera pas le même. De façon générale, les lésions simples ne touchant qu'une seule base modifiée (8-OHdG, FapyG...) sont réparées par les protéines de la voie BER (*base excision repair*) ou MR (*mismatch repair*) qui modifient uniquement une base, tandis que les lésions plus encombrantes comme les liaisons covalentes entre bases sont prises en charge par les protéines de la voie NER (*nucleotide excision repair*) qui remplacent un plus long morceau du brin endommagé. Cependant, ces processus de réparation peuvent parfois insérer des erreurs dans la séquence de nucléotides ou ne pas se poursuivre jusqu'au bout, entraînant la formation de sites abasiques ou de cassures de l'ADN. De plus, si toutes les erreurs ne sont pas détectées et réparées, lors du processus de réplication la lecture des bases modifiées sur le brin matrice peut entraîner l'insertion du mauvais nucléotide dans le brin complémentaire. En effet, dans le cas de la base 8-OHdG, son appariement avec la cytosine est reconnu comme un mésappariement, tandis que son association avec l'adénine ne l'est pas. C'est pourquoi l'oxydation de la guanine conduit fréquemment à une conversion de la guanine en thymine dans la séquence de l'ADN (Jena, 2012 ; Melis *et al.*, 2012).

Dans le cas des spermatozoïdes, les dommages à l'ADN dus au stress oxydant peuvent se produire à la fois sur l'ADN du noyau spermatique et sur l'ADN mitochondrial. L'ADN nucléaire est d'ailleurs moins sensible aux lésions induites par une exposition à l'H₂O₂ que l'ADN mitochondrial. Cette résistance accrue aux EOR est probablement due à la condensation extrême de l'ADN nucléaire spermatique par les protamines. Cependant ce n'est peut-être pas la seule raison car l'ADN mitochondrial et l'ADN nucléaire des spermatozoïdes sont tous les deux plus résistants à l'H₂O₂ que l'ADN mitochondrial et l'ADN nucléaire de cellules somatiques en culture (Sawyer *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'ensemble des dommages à l'ADN spermatique ne pourra pas être réparé par le spermatozoïde lui-même car son ADN très compacté est inaccessible et car l'ensemble de la machinerie cellulaire a été réduite à son minimum lors de la spermiation. C'est uniquement lors de la fécondation que l'ovocyte prendra en charge la réparation des dommages de l'ADN spermatique.

c. L'impact des dommages oxydants spermatiques sur la fertilité

L'ensemble de ces dommages oxydants sur les différents composants des spermatozoïdes peut potentiellement provoquer une perte de fonction des spermatozoïdes. Ainsi, ce type de dommages a été associé à une infertilité masculine lors de nombreuses études chez les animaux comme chez l'homme. L'infertilité d'un couple est définie comme une incapacité à procréer après un an de rapports sexuels en absence de contraception. L'infertilité concerne environ 10 à 15 % des couples et l'homme est impliqué seul ou avec la femme dans 50 à 60 % des cas. Les causes de l'infertilité masculine sont variées et peuvent être multifactorielles (tableau 3). Elles peuvent être d'origine génétique (anomalies chromosomiques, mutations, microdélétions), environnementale (exposition à la chaleur, à des pesticides, des médicaments anti-cancéreux,...), hormonale, infectieuse et, dans 30 % des cas, inconnue (infertilité idiopathique). L'infertilité masculine peut se traduire ou non par des variations des paramètres spermatiques comme le nombre de spermatozoïdes et la proportion de gamètes mobiles, vivants ou de morphologie normale. Lorsque

Complications	Fold changes	References
Malformation singleton	OR 1.35 (1.20 – 1.51)	Hansen et al. (2005)
	OR 1.30 (1.16 – 1.45)	Davies et al. (2012)
Malformation multiple birth	OR 1.16 (0.91 – 1.49)	Davies et al. (2012)
Chromosomal anomalies singleton	OR 0.87 (0.57 – 1.33)	Davies et al. (2012)
Chromosomal anomalies multiple birth	OR 1.34 (0.42 – 4.33)	Davies et al. (2012)
Chromosomal anomalies (post-ICSI):		Bonduelle et al. (1998)
<i>De novo</i> chromosomal aberrations	1.66% (1.0 – 2.7%) versus 0.44% ^a	
Sex–chromosomal	0.83% (0.3 – 1.6%) versus 0.19% ^a	
Septal heart defects singleton	OR 2.1 (1.1 – 4.0)	Reefhuis et al. (2009)
Septal heart defects twins	OR 1.3 (0.6 – 2.8)	Reefhuis et al. (2009)
Esophageal atresia singleton	OR 4.5 (1.9 – 10.5)	Reefhuis et al. (2009)
Esophageal atresia twins	OR 2.2 (0.7 – 7.3)	Reefhuis et al. (2009)
Hypospadias singleton	OR 2.1 (0.9 – 5.2)	Reefhuis et al. (2009)
Hypospadias twins	OR 2.1 (0.7 – 6.4)	Reefhuis et al. (2009)
Cancer total:	OR 1.42 (1.09 – 1.87)	Kallen et al. (2010a, b, c)
Hepatoblastoma	RR 56.9 (24.0 – 130.7)	McLaughlin et al. (2006)
Retinoblastoma	RR 4.9 (1.6 – 11.3)	Moll et al. (2003)
Leukemia	OR 2.2 (1.2 – 3.85)	Petridou et al. (2012)
Metabolic disease:		Ceelen et al. (2008a, b)
Hypertension		
Systolic	OR 2.1 (1.4 – 3.3)	
Diastolic	OR 1.9 (1.2 – 3.0)	
Elevated fasting glucose	5.0 versus 4.8 (mmol/l) (P ¹ / ₄ 0.005)*	
Imprinting disorders:		
AS	2 – 3-fold increased risk*	Manipalviratn et al. (2009)
Beckwith – Widemann syndrome		
Cerebral palsy singleton	OR 2.8 (1.3 – 5.8)	Stromberg et al. (2002)
	OR 1.82 (1.31 – 2.52)	Hvidtjorn (2006)
Cerebral palsy twins	OR 0.9 (0.4 – 1.8)	Stromberg et al. (2002)
	OR 1.00 (0.65 – 1.52)	Hvidtjorn (2006)

Tableau 4 : Les risques pédiatriques associés à la procréation médicalement assistée

* Indique que les OR ou RR ne sont pas disponibles ; OR : *odd ratio* ou rapport des chances ; RR : *relative risk* ou risque relatif (Feuer *et al.*, 2013).

ces paramètres respectent les normes établies par l'Organisation Mondiale de la Santé, on parle de normozoospermie. Les anomalies constatées lors d'un spermogramme sont :

- l'azoospermie : une absence totale de spermatozoïdes ;
- l'oligozoospermie : une concentration en spermatozoïdes < 15 millions/mL ;
- l'asthénozoospermie : une proportion de spermatozoïdes mobiles < 40 % ;
- la tératozoospermie : une quantité de gamètes de morphologie normale < 4 % ;
- la nécrozoospermie : une proportion de spermatozoïdes morts > 50 %.

Ces différentes anomalies peuvent également être associées comme chez de nombreux patients présentant une oligoasthénotératozoospermie. Les données biochimiques (présence de certaines molécules, concentration, activité enzymatique...) concernant la composition du plasma séminal et des spermatozoïdes et les données structurelles des gamètes (intégrité de l'acrosome, cassures de l'ADN...) sont plus rarement analysées et sont souvent réservées à des recherches cliniques. Ces dernières ont permis de mettre en lien une augmentation des dommages oxydants des spermatozoïdes et une infertilité masculine.

Chaque type de dommage peut intervenir à un moment donné du processus de la reproduction. Ainsi, la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines sont surtout délétères pour les événements allant de la capacitation des spermatozoïdes à la fusion des gamètes. Comme nous l'avons déjà évoqué, l'augmentation de la peroxydation lipidique des spermatozoïdes entraîne rapidement une perte de la mobilité, empêchant les gamètes mâles de rejoindre l'ovocyte (Gomez *et al.*, 1998). D'autre part, l'induction de la peroxydation des membranes des spermatozoïdes les conduit à une diminution de leur capacité de fusion avec l'oolemmme lors de la fécondation (Aitken *et al.*, 1989). Une incubation de spermatozoïdes de taureau ou de cochon avec une forte concentration en H_2O_2 est aussi inhibitrice des phosphorylations se déroulant lors de la capacitation (Awda *et al.*, 2009), ce qui est susceptible de limiter la réussite des étapes suivantes de réaction acrosomique et de fécondation de l'ovocyte.

Les dommages oxydants à l'ADN sont plutôt impliqués dans les problèmes rencontrés lors du développement embryonnaire, après la fécondation, et peut-être aussi lors de la vie de l'enfant, après sa naissances. On peut supposer que si les dommages sont trop nombreux, certains ne seront pas réparés par l'ovocyte fécondé et conduiront à des mutations de l'ADN de l'embryon, voire à une mort cellulaire dès le stade de zygote. Cette hypothèse semble corroborée par le fait que les hommes infertiles présentent une plus forte oxydation de l'ADN spermatique que les hommes fertiles (Aitken & Curry, 2011). De plus, chez des souris présentant un fort taux d'oxydation de l'ADN spermatique, une augmentation des taux d'anomalies du développement, de fausses-couches et de mortalité périnatale a pu être observée (Chabory *et al.*, 2009). Lors de protocoles de Procréation Médicalement Assistée (PMA), le développement pré-implantatoire des embryons est négativement corrélé avec les cassures de l'ADN, démontrées par différentes méthodes (Comet, TUNEL, SCSA) (Lewis & Aitken, 2005). La fragmentation de l'ADN spermatique est également négativement corrélée au taux de grossesse suite à une ICSI avec des spermatozoïdes testiculaires ou éjaculés et elle semble associée à une augmentation des taux de fausses-couches, que ce soit par conception naturelle ou médicalement assistée (Lewis & Aitken, 2005). Les dommages oxydants à l'ADN sont aussi soupçonnés d'être à l'origine de la plus forte susceptibilité des enfants nés par

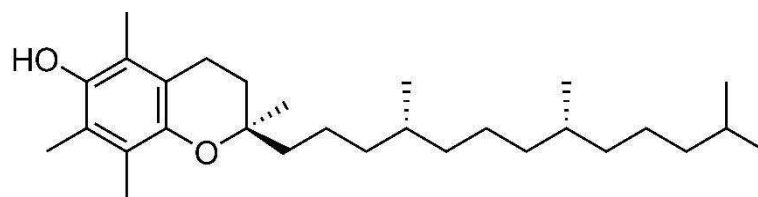


Figure 48 : La vitamine E ou α -tocophérol

ICSI à des maladies d'origines génétiques ou épigénétiques (tableau 4) (Aitken & Curry, 2011). Cependant, il est difficile d'établir de façon certaine qui, du protocole de PMA ou des gamètes issus de parents infertiles, est à l'origine de cette augmentation de la susceptibilité aux maladies chez ces enfants, puisque la majorité des études sur le sujet compare les enfants issus de PMA avec ceux conçus naturellement par des couples parfaitement fertiles (Feuer *et al.*, 2013). Les travaux faisant des comparaisons avec des enfants naturellement conçus par des couples infertiles ou peu fertiles sont plus rares. Il est tout à fait possible que ce soit l'association des gamètes préalablement en mauvais état et des différents stress générés par les protocoles de PMA qui soient à l'origine de cette augmentation des risques de mauvaise santé chez ces enfants.

3. Les systèmes de régulation des EOR protégeant les spermatozoïdes

Comme nous l'avons vu, les EOR sont à la fois indispensables au bon déroulement de la maturation des spermatozoïdes et nocifs pour eux. Il apparaît donc évident que la concentration en EOR doit être finement régulée tout au long du transit des gamètes du testicule jusqu'à l'ovocyte dans le tractus génital femelle. Cette régulation est réalisée par différentes molécules dites « antioxydantes ». Ces molécules éliminent les EOR au fur et à mesure de leur production de façon à maintenir une concentration constante. Parfois, elles sont également capables de corriger certaines lésions cellulaires causées par les EOR, comme par exemple les lipides peroxydés membranaires. L'action des antioxydants peut être enzymatique ou non-enzymatique. Nous allons maintenant passer en revue les principaux antioxydants intervenants dans l'organisme ou utilisés dans le traitement du stress oxydant dans le cadre d'une infertilité masculine.

a. Les mécanismes non enzymatiques de recyclage des EOR

➤ Les vitamines

Les vitamines sont des molécules organiques intervenant dans de nombreuses fonctions physiologiques à de très faibles doses. La grande majorité d'entre elles ne sont pas synthétisées par l'organisme, à l'exception des vitamines D et K. Elles sont donc apportées par l'alimentation, généralement par les fruits et légumes. Certaines vitamines jouent un rôle antioxydant, comme les vitamines C, E et B9.

La vitamine E a été découverte en 1922 en tant qu'élément alimentaire essentiel pour la fonction de reproduction des rats (Evans & Bishop, 1922). C'est une molécule organique liposoluble, apportée par l'alimentation, qui peut être stockée par l'organisme. Il existe 8 formes de vitamine E, les tocophérols et les tocotriénols de formes α -, β -, γ -, and δ -, mais seul l' α -tocophérol (figure 48) est efficacement reconnu par l' α -TTP (*α -tocopherol transfer protein*), une protéine hépatique qui participe au processus de stockage/libération de la vitamine E dans l'organisme. Toutes les autres formes sont immédiatement métabolisées puis excrétées.

L' α -tocophérol possède une propriété antioxydante due à sa capacité à donner un atome d'hydrogène. Ceci leur permet de réagir facilement avec les molécules radicalaires. Ainsi, le tocophérol devient un radical à son tour qui formera une molécule neutre par conjugaison avec un autre radical ou sera régénérée par d'autres molécules antioxydantes (vitamine C, glutathion,

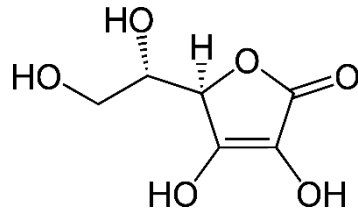


Figure 49 : La vitamine C ou acide ascorbique

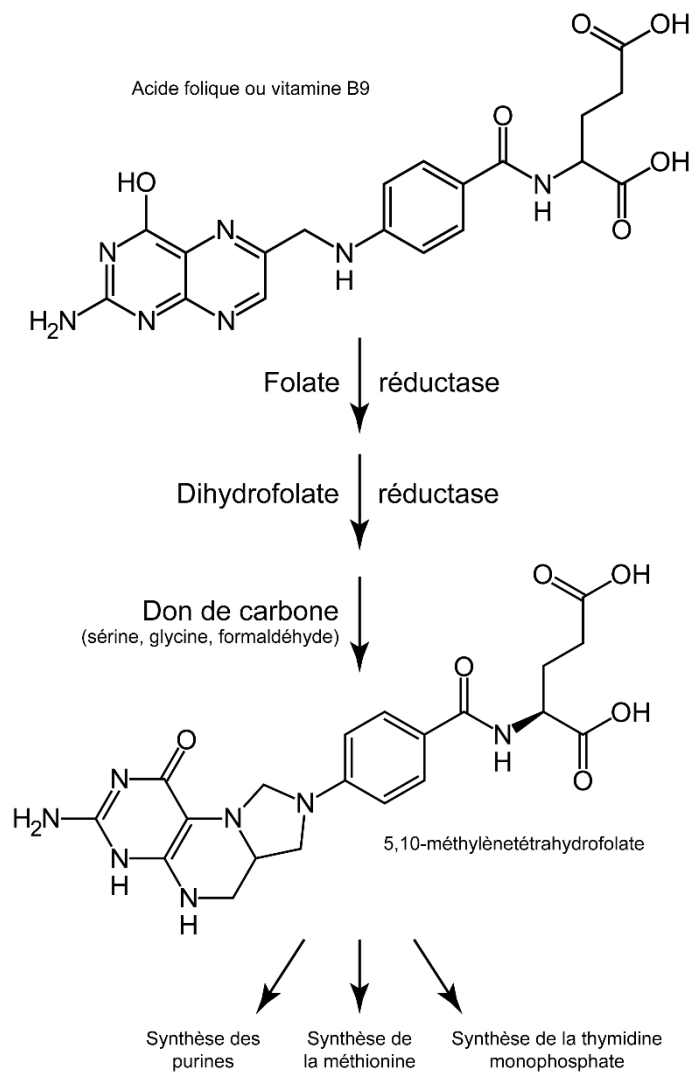


Figure 50 : La vitamine B9 ou l'acide folique

co-enzyme Q10). De cette façon, la vitamine E bloque les cascades de réactions générées par les EOR. Étant liposoluble, elle peut facilement s'insérer dans la bicouche lipidique des membranes, ce qui en fait un antioxydant de choix dans la protection contre la peroxydation lipidique au sein des membranes (Traber & Atkinson, 2007).

Les études *in vivo* des effets de la vitamine E sur les paramètres spermatiques ne montrent pour la plupart aucun effet de la vitamine E. Seul les travaux de Suleiman *et al.* (1996) montrent que le traitement de patients présentant une asthénozoospermie avec 300 mg/jour de vitamine E pendant 6 mois a conduit à une diminution de la peroxydation lipidique des spermatozoïdes, une augmentation de la mobilité spermatique et une augmentation du taux de grossesse par rapport au groupe contrôle. *In vitro*, la cryopréservation du sperme en présence de vitamine E préserve mieux la mobilité des spermatozoïdes qu'en absence de vitamine (Lombardo *et al.*, 2011).

La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule soluble dans l'eau (figure 49). À pH physiologique, la vitamine C est principalement sous forme d'ascorbate monoanionique qui est la forme capable de céder un à deux électrons, ce qui explique son pouvoir antioxydant. L'ascorbate réduit facilement différents radicaux dont OH^\bullet , les radicaux alkoxy (RO^\bullet), les radicaux lipidiques peroxy (LOO^\bullet) et la forme radicalaire de l' α -tocophérol (TO^\bullet). La forme radicalaire de l'ascorbate produite peut être régénérée par différentes enzymes dont la réductase dépendante du NADPH et la thiorédoxine réductase. Il faut cependant noter qu'une forte concentration en ascorbate associée à une forte concentration en fer est à l'origine d'une production de OH^\bullet , qui augmente alors le stress oxydant (Du *et al.*, 2012).

La concentration en vitamine C est plus importante dans le liquide séminal que dans le plasma sanguin, laissant supposer un rôle important de la vitamine C dans la physiologie des spermatozoïdes. De plus, une corrélation positive a été démontrée entre la concentration en acide ascorbique et le pourcentage de spermatozoïdes morphologiquement normaux. De même, les éjaculats avec de mauvais paramètres spermatiques et associés à un stress oxydant contiennent une concentration significativement plus faible d'acide ascorbique que les éjaculats présentant une meilleure qualité (Agarwal *et al.*, 2012).

Les effets antioxydants semblent synergiques lorsque les vitamines C et E sont associées lors du traitement *in vitro* de spermatozoïdes humains, avec une diminution des dommages oxydants sur l'ADN spermatique. Cependant, plusieurs études *in vivo* ne montrent aucun effet de ces vitamines sur les paramètres spermatiques ou le taux de grossesse, qu'elles soient seules ou associées (Lombardo *et al.*, 2011).

La vitamine B9, également appelée acide folique, vitamine M ou folacine (figure 50), est une molécule hydrosoluble apportée par l'alimentation (légumes à feuilles, légumineuses, abats). Elle est transformée *in vivo* en 5,10-méthylènetétrahydrofolate par des enzymes. Ce composé participe à la synthèse des bases azotées (A, G, T) et de la méthionine. La vitamine B9 est donc importante pour la synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines. Cependant, elle agit également comme une molécule antioxydante par réaction directe avec les radicaux tels que OH^\bullet et les radicaux thiyles (RS^\bullet) et par inhibition de la peroxydation lipidique (Joshi *et al.*, 2001).

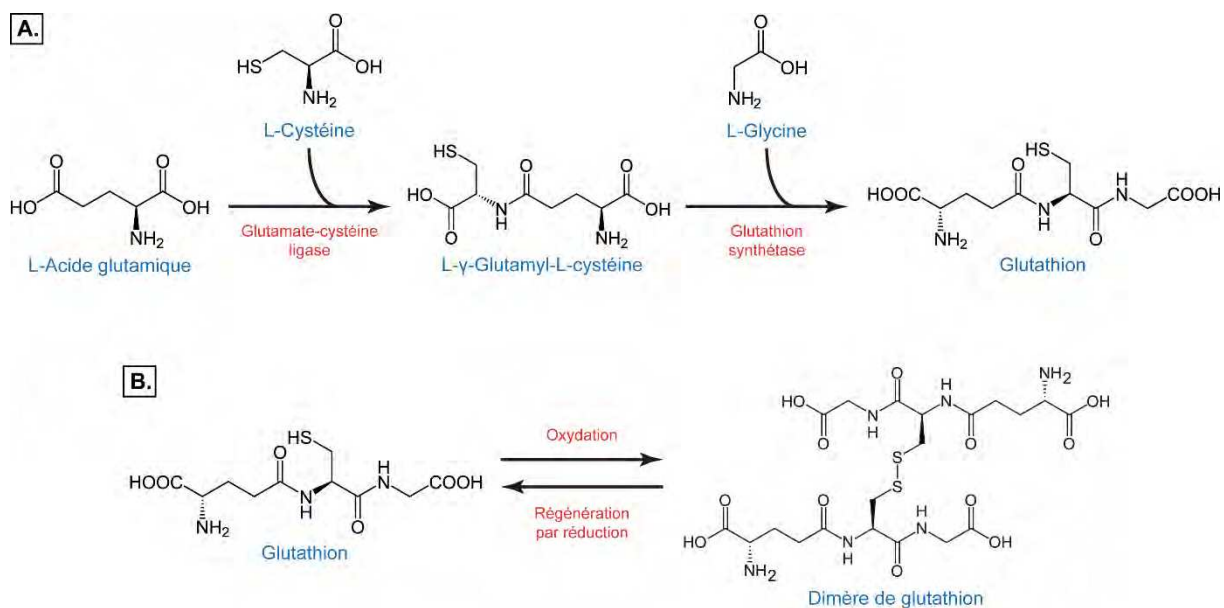


Figure 51 : La synthèse et le rôle du glutathion

Le glutathion est un tripeptide formé en deux étapes sous la direction d'enzymes (A). La première est catalysée par la glutamate cystéine ligase (GCL) qui, comme son nom l'indique, va associer un acide glutamique et une cystéine pour former la γ -glutamylcystéine. À cette molécule est ajoutée une glycine par la glutathion synthétase, formant ainsi le GSH. L'oxydation de celui-ci par réaction avec les EOR ou avec le site actif d'enzymes conduit à la formation d'un dimère de GSH, qui pourra être régénéré par une réaction de réduction réalisée par l'enzyme glutathion réductase (B).

Chez l'homme, une étude en particulier montre un effet positif d'une supplémentation de 15 mg/jour d'acide folinique (métabolite actif de l'acide folique) pendant 3 mois chez des patients atteints d'un syndrome d'infertilité idiopathique, avec une augmentation du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes (Bentivoglio *et al.*, 1993). Les autres études sur la supplémentation en vitamine B9 ou en ses métabolites actifs ne présentent pas d'amélioration des paramètres spermatiques à la fin du traitement, excepté lorsqu'on y associe une supplémentation en zinc, probablement parce que le zinc est un cofacteur des enzymes chargées du métabolisme de la vitamine B9 et des enzymes de synthèse de la méthionine (Wong *et al.*, 2002 ; Ebisch *et al.*, 2007). Ainsi, l'action positive de la vitamine B9 sur la fonction de reproduction chez l'homme proviendrait surtout de son action sur la synthèse des acides nucléiques et de la méthionine.

➤ **Le glutathion**

Parmi les nombreux composés de faible poids moléculaire impliqués dans la régulation du stress oxydant se trouve un tripeptide γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine : le glutathion (GSH). Il s'agit de la plus abondante molécule non-protéique comportant un groupement thiol dans la cellule. Elle est synthétisée *de novo* par une réaction en deux étapes (figure 51A). La synthèse du GSH est soumise à deux facteurs limitant : la disponibilité en cystéine et l'activité de la glutamate cystéine ligase (GCL) qui catalyse la première étape. Cette activité enzymatique de la GCL est régulée par la concentration en GSH elle-même, par phosphorylation et par l'expression des deux gènes codant pour les deux sous-unités de la GCL (Zhang & Forman, 2012).

Le glutathion joue un grand rôle antioxydant grâce au groupement thiol ($-SH$) apporté par la cystéine. Il agit par réaction directe avec les EOR ou en participant aux réactions enzymatiques d'élimination des EOR que nous verrons par la suite. Le groupement thiol permet au GSH de céder facilement un électron sous forme d'atome d'hydrogène aux molécules instables dont les EOR. Que la réaction d'oxydoréduction soit enzymatique ou non, elle conduit à la formation d'un dimère de glutathion oxydé (GSSG) (figure 51B). La régénération du GSSG en GSH est rapidement réalisée par une enzyme, la glutathion réductase (GR) dépendante du NADPH, et parfois par les thiorédoxines si nécessaire (Nordberg & Arnér, 2001). Le ratio GSH/GSSG dans un tissu est souvent utilisé pour mesurer le statut d'oxydoréduction. Une diminution de ce rapport est due à une accumulation de GSSG dans les cellules et est donc le signe d'un stress oxydant.

Le GSH est présent en forte concentration dans le fluide séminal (1,5 μM). Cette concentration est corrélée positivement à la mobilité des spermatozoïdes et négativement à la morphologie des spermatozoïdes. De plus, elle est significativement réduite chez les hommes infertiles (Rajmakers *et al.*, 2003). La concentration en GSH dans les spermatozoïdes semble également plus faible chez les hommes présentant moins de 5 % de spermatozoïdes de morphologie normale dans leur éjaculat par rapport aux autres (spermatozoïdes normaux ≥ 5 %) (Garrido *et al.*, 2004). Dans une autre étude, bien qu'aucune différence ne puisse être observée dans la concentration séminale en GSH entre les patients fertiles et infertiles, la concentration en GSH dans les spermatozoïdes eux-mêmes est plus faible chez les hommes présentant une oligozoospermie que chez les hommes présentant des paramètres spermatiques normaux (Ochsendorf *et al.*, 1998). Une corrélation positive entre la concentration intra-spermatique en GSH et la capacité à traverser le mucus cervical a également été démontrée bien qu'elle soit faible (Ochsendorf *et al.*, 1998).

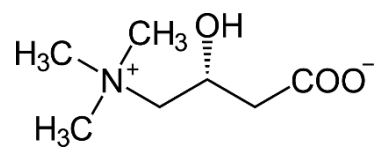


Figure 52 : La L-carnitine

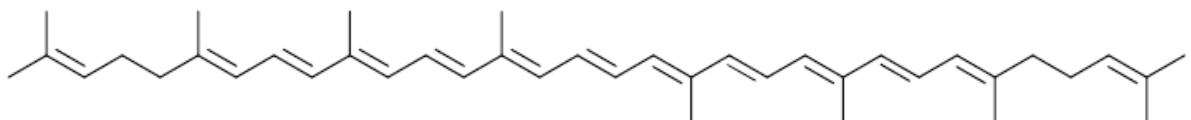


Figure 53 : Le lycopène

➤ **La L-carnitine**

La L-carnitine est une petite molécule très polaire et hydrosoluble possédant une fonction ammonium quaternaire (NR_4^+) (figure 52). La L-carnitine peut être synthétisée par les animaux, dont l'homme, à partir de lysine et de méthionine et avec l'aide de la vitamine C et du fer. Cependant, une part de la L-carnitine présente dans notre organisme provient de notre alimentation (viande, poisson, produits laitiers, avocats). Cette molécule joue un rôle important dans le transport des acides gras libres à longues chaînes entre le cytosol et la matrice mitochondriale, où ils seront catabolisés par β -oxydation afin de pouvoir rentrer dans le cycle de Krebs et fournir de l'énergie à la cellule. La L-carnitine semble également jouer un rôle de molécule antioxydante dans différents tissus. Elle induit en effet une diminution de la peroxydation lipidique et de la production d'EOR. Le mécanisme par lequel elle intervient n'est cependant pas démontré.

Dans le tractus génital mâle, la L-carnitine est sécrétée par les épithélia testiculaire et épидидymaire dans le fluide, où elle atteint une concentration très élevée par rapport au plasma sanguin. Elle est aussi présente dans le spermatozoïde épидидymaire lui-même. Après l'éjaculation, elle est principalement retrouvée dans le plasma séminal et peu dans les spermatozoïdes. Chez l'homme, une corrélation positive a été établie entre la concentration séminale en L-carnitine et le nombre, la morphologie et la mobilité des spermatozoïdes. De plus, les hommes infertiles présentent une concentration plus faible en L-carnitine que les hommes fertiles (Agarwal & Said, 2004).

Lors d'une étude clinique, des patients infertiles atteints de prostatite-vésiculo-épидидymite non-bactérienne ont pris une supplémentation en L-carnitine pendant 3 à 4 mois. La comparaison des analyses avant et après traitement a montré une diminution de la concentration en EOR dans l'éjaculat et une augmentation de la mobilité des spermatozoïdes (Agarwal & Said, 2004). L'effet de la L-carnitine sur la mobilité spermatique a également été démontré dans une autre étude clinique comparant un groupe d'hommes infertiles (asthénozoospermie idiopathique, $n=47$) et fertiles ($n=110$) ayant pris oralement 3 g/jour de L-carnitine pendant 3 mois. Les résultats montrent que 80 % des patients infertiles présentent une augmentation de la mobilité spermatique, atteignant alors un niveau presque identique à celui des hommes fertiles. De plus, la concentration moyenne en spermatozoïdes a augmenté de plus de 40 % après le traitement (Vitali *et al.*, 1995).

➤ **Le lycopène**

Le lycopène est un pigment naturel liposoluble rouge de la famille des carotènes, uniquement synthétisé par les plantes et les microorganismes. Il est donc présent dans de nombreux fruits et légumes. Cette molécule comporte deux doubles liaisons non-conjuguées et onze conjuguées qui lui confèrent sa propriété antioxydante (figure 53). En effet, les EOR réagissent facilement avec ces nombreuses doubles liaisons, limitant les réactions avec d'autres composants de la cellule. Le nombre important de ses doubles liaisons conjuguées en font la molécule avec le plus fort pouvoir antioxydant. Étant donné sa nature hydrophobe, le lycopène s'insère dans les membranes de la cellule et les protège des EOR. Plusieurs travaux ont également mis en évidence son action antioxydante par le biais de la régulation des voies de signalisation impliquées dans le contrôle du statut redox de la cellule (Palozza *et al.*, 2012).

Les études sur les effets du lycopène sur la fonction de reproduction chez le mâle sont encore peu nombreuses et ont presque toutes été réalisées *in vitro*. Le lycopène, quand il est ajouté au milieu de préservation de spermatozoïdes de lapin pour la réfrigération ou la cryopréservation, semble protéger les gamètes de la peroxydation lipidique. Les spermatozoïdes sont alors plus mobiles, plus résistants au stress osmotique et plus viables après le réchauffement des échantillons (Rosato *et al.*, 2012). La pré-incubation de spermatozoïdes humains avec du lycopène les protège de la fragmentation de l'ADN induite par l'ajout de H_2O_2 , mais pas de la perte de mobilité (Zini *et al.*, 2010). L'utilisation de lycopène lors de la cryopréservation des spermatozoïdes de bélier limite les dommages oxydants observés après décongélation : diminution de la mobilité, de la viabilité et de la résistance au stress osmotique, augmentation des spermatozoïdes anormaux et perte de l'acrosome. Cependant, cette même étude montre qu'une trop forte dose de lycopène entraîne des effets délétères (Uysal & Bucak, 2007). En 2000, trente patients d'une clinique indienne avec une infertilité idiopathique non-obstructive ont été traités pendant 3 mois avec 4 mg/jours de lycopène. Après le traitement, 20 d'entre eux présentaient une augmentation de la concentration en spermatozoïdes, 16 une augmentation de la mobilité et 14 une augmentation des spermatozoïdes morphologiquement normaux. Cependant, ces améliorations des paramètres spermatiques n'ont concerné que les patients ayant une concentration en spermatozoïdes > 5 millions/mL : les cas plus sévères n'ont montrés aucune amélioration (Gupta & Kumar, 2002).

➤ **Le sélénium**

Le sélénium (Se) est un oligo-élément que l'organisme ne semble pas pouvoir stocker. Il ne peut être apporté que par l'alimentation (viande, céréales, champignons...). La carence comme la surdose en sélénium sont tout aussi délétères pour la santé l'une que l'autre et les seuils sont facilement atteints. Les effets antioxydants du sélénium sont généralement attribués à l'incorporation du sélénium sous forme de sélénocystéine dans de nombreuses enzymes antioxydantes que nous décrirons plus loin. Cependant, le sélénium est aussi un composant d'un certain nombre de molécules organiques et inorganiques ayant une activité antioxydante par réaction directe avec les EOR. Certaines de ces molécules ont par ailleurs la capacité de se lier aux ions métalliques généralement impliqués dans l'induction de la production des EOR (fer, cuivre...), cette capture des métaux empêchant toute réaction pro-oxydante (Battin & Brumaghim, 2009).

Les travaux sur les effets du sélénium dans le traitement de l'infertilité masculine ont rarement été menés sans addition d'un autre antioxydant (vitamines, GSH...) et en utilisant des dosages très différents. Les résultats sont donc difficiles à interpréter. Des travaux parus en 1995 n'ont montré aucun effet du traitement de 33 hommes infertiles par 200 μ g de Se/jours pendant 3 mois. Cependant, divers traitements à base de Se et d'autres antioxydants présentent en général des résultats positifs sur l'amélioration des paramètres spermatiques (Lombardo *et al.*, 2011).

➤ **Le zinc**

Le zinc (Zn) est lui aussi un oligo-élément apporté par l'alimentation (viande, fruits de mer). Il n'existe dans l'organisme que sous sa forme ionique : Zn^{2+} . Il intervient en tant que composant structural ou régulateur dans un grand nombre de processus cellulaires et de molécules biologiques. Ainsi, pour plus de 2700 enzymes, il participerait comme élément structural, substrat ou régulateur d'activité. Le Zn est impliqué dans la synthèse des acides nucléiques, des protéines et des lipides, dans la protection de l'ADN (activité antioxydante, processus de réparation, remodelage de la

chromatine...), dans la régulation de la transcription... Dans les cellules, le Zn est surtout lié à différentes molécules biologiques (protéines, GSH, cystéine, histidine...) mais il existe également des réserves de Zn « facilement échangeable » (Oteiza, 2012). Il a été établi dans différents types cellulaires et tissus qu'une déficience en Zn cause un stress oxydant avec une augmentation de la concentration en EOR, une perte des molécules antioxydantes et une augmentation des divers marqueurs de l'oxydation des tissus. La présence du Zn protège donc les cellules du stress oxydant. Cependant, le Zn intervient dans tellement de processus biologiques et est présent dans tant de composés cellulaires qu'il est difficile de déterminer les mécanismes exacts sur lesquels repose son activité antioxydante. Ces mécanismes semblent multiples et interconnectés et ne reposent pas sur sa capacité à réaliser des réactions d'oxydoréduction car il ne l'a pas. Ainsi, parmi ces actions du Zn se trouvent :

- L'inhibition de protéines régulant directement ou non la production d'EOR ;
- La compétition avec les métaux (fer, cuivre) sur les sites de fixation des membranes, limitant ainsi l'initiation de la peroxydation lipidique ;
- L'interaction dynamique avec les groupements thiols des protéines et peptides pour constituer une réserve de Zn facilement mobilisable en cas de stress oxydant ;
- La stimulation de la synthèse de protéines capables d'éliminer les EOR ;
- La régulation de cascades de signalisation modulant les défenses antioxydantes (Oteiza, 2012).

Dans le tractus génital mâle, la concentration en Zn est très élevée par rapport aux autres organes et fluides de l'organisme. Elle est surtout forte dans la prostate et dans le plasma séminal. La relation entre la concentration séminale en Zn et la fertilité n'est pas claire. Certains travaux n'en trouvent pas, tandis que d'autres montrent que les hommes avec une infertilité idiopathique ont une plus faible concentration en zinc dans le plasma séminal que les hommes fertiles. De même, les hommes présentant une faible concentration en spermatozoïdes possèdent une plus faible concentration en zinc dans le plasma séminal que les hommes avec une plus forte concentration en spermatozoïdes (Ebisch *et al.*, 2007). L'induction d'une déficience en zinc chez des hommes en bonne santé et fertiles cause une chute du nombre de spermatozoïdes, du taux de testostérone et des pulsions sexuelles, qui peuvent être expliquées par une perte de fonction des cellules de Leydig. Une étude portant sur les effets de la supplémentation antioxydante sur les paramètres spermatiques a permis de comparer les effets du sulfate de zinc (66 mg/j) seul, de la vitamine B9 (5 mg/j) seule et d'une association des deux traitements. Cette étude a été réalisée sur des hommes fertiles et des hommes présentant une oligozoospermie idiopathique pendant 26 semaines de traitement. Les résultats montrent que les traitements avec uniquement le Zn ou la vitamine B9 n'ont pas d'effet sur les paramètres spermatiques des hommes fertiles et infertiles, tandis que l'association des deux suppléments n'a pas d'effet sur les hommes fertiles mais entraîne chez les hommes infertiles une augmentation de la concentration en spermatozoïdes et du nombre total de spermatozoïdes normaux, bien que la proportion de spermatozoïdes anormaux soit aussi légèrement augmentée (Wong *et al.*, 2002).

b. Les mécanismes enzymatiques de recyclage des EOR

➤ *La superoxyde dismutase*

L'enzyme superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine capable de catalyser la dismutation de $O_2^{\bullet -}$ en dioxygène et en H_2O_2 . Il s'agit d'une enzyme antioxydante, même si on pourrait s'étonner au premier abord de l'intérêt de transformer l' $O_2^{\bullet -}$ peu réactif en H_2O_2 moins stable et à l'origine des plus dangereux EOR. Le fait est que l' $O_2^{\bullet -}$ ne peut pas traverser les membranes à cause de sa charge : il va donc s'accumuler sur son site de production, comme la mitochondrie par exemple. Seulement, si l' $O_2^{\bullet -}$ n'est que peu réactif, il risque malgré tout de causer beaucoup de dégâts s'il reste trop longtemps au même endroit en forte concentration. La solution est donc de le transformer en une molécule qui sera capable de sortir et pourra être éliminée définitivement par d'autres enzymes.

Il existe trois familles de SOD dans le monde vivant. Les plus importantes caractéristiques permettant de différencier ces familles tiennent aux ions métalliques qui leur confèrent leur activité et à leur conformation spatiale. La famille la plus étudiée comprend la SOD à manganèse (MnSOD) et la SOD à fer (FeSOD). Dans le règne animal, seule la MnSOD est présente. Cette protéine homotétramérique est codée par un gène nucléaire, *sod2*, puis transportée dans la matrice mitochondriale où elle détoxifie les $O_2^{\bullet -}$ produits par la respiration cellulaire. Dans les mitochondries se trouve également une SOD appartenant à une autre famille : les SOD dépendantes du cuivre et du zinc (Cu/ZnSOD). Cette SOD codée par le gène *sod1* est située dans l'espace intermembranaire des mitochondries, ainsi que dans le cytoplasme et le noyau des cellules. Dans cette famille des Cu/ZnSOD, il existe également une SOD homotétramérique, produit du gène *sod3*, qui est sécrétée par les cellules dans l'espace intercellulaire. La majeure partie de cette protéine glycosylée va rester fixée sur les protéoglycanes à sulfate d'héparane qui composent la matrice extracellulaire et la glycocalyx entourant les cellules. SOD3 forme ainsi une ligne de défense contre les EOR provenant de l'extérieur de la cellule. Il existe cependant une exception chez le rat où SOD3 est dimérique, ne se fixe pas à la matrice extracellulaire et est uniquement sous forme libre dans les fluides (Mruk *et al.*, 2002). La dernière famille de SOD est dépendante du nickel (NiSOD) mais elle n'existe que chez quelques grandes familles de bactéries.

Dans le tractus génital masculin, SOD est très exprimée. Par exemple, chez le rat, la plus forte expression de SOD est retrouvée dans l'épididyme et son expression par les cellules germinales et de Sertoli dans le testicule est importante également (Mruk *et al.*, 2002). Chez l'Homme, plusieurs travaux ont tenté de relier la présence et l'activité des SOD dans les spermatozoïdes ou le plasma séminal aux paramètres spermatiques et à la fertilité. Ainsi, plus les spermatozoïdes sont matures et moins ils présentent d'activité Cu/ZnSOD (Calamera *et al.*, 2003). Par ailleurs, dans le cadre de la conservation des spermatozoïdes lors de procédures de PMA, il semblerait qu'une plus grande activité de Cu/ZnSOD dans les gamètes soit associée à une plus grande protection contre la perte de mobilité lors de la décongélation (Buffone *et al.*, 2012). Cependant, établir une corrélation entre l'activité SOD dans les spermatozoïdes ou le plasma séminal et la fertilité semble poser un problème. Une étude affirme qu'il n'y en a pas (Hsieh *et al.*, 2002). D'autres trouvent un lien mais ne sont pas d'accord sur le sens de la corrélation. Ainsi, certains travaux montrent que les hommes fertiles présentent une plus forte concentration ou activité SOD dans le plasma séminal que les hommes infertiles (Calamera *et al.*, 2003 ; Murawski *et*

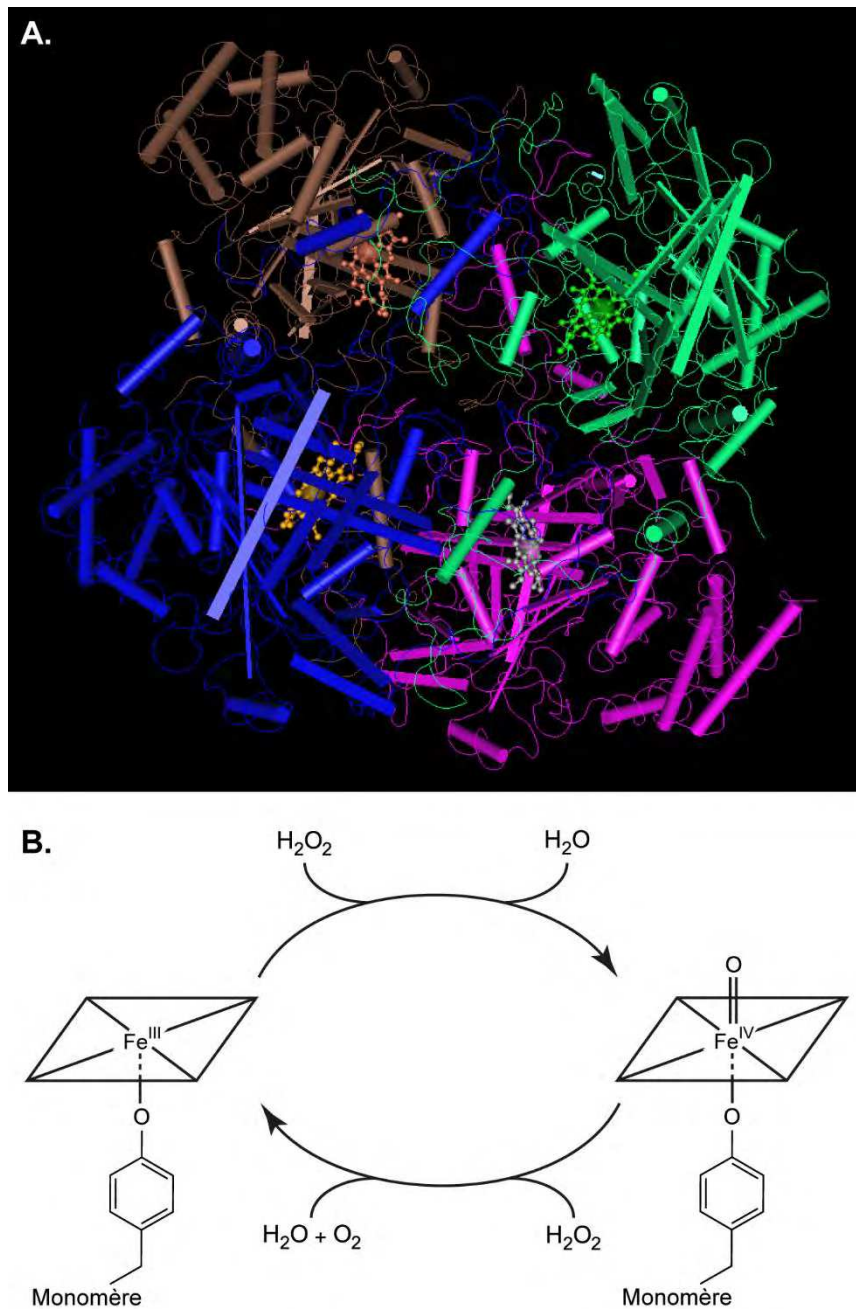


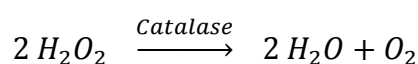
Figure 54 : La catalase

La catalase humaine est formée de 4 monomères possédant chacun un hème avec du fer, associé à un résidu tyrosine (A ; MMBD ID : 10605 ; diffraction des rayons X, résolution 2,75 Å). Cet hème réalise la réaction de réduction du peroxyde d'hydrogène (B).

al., 2007 ; Zelen *et al.*, 2010), tandis que d'autres démontrent le résultat inverse (Zini *et al.*, 2000 ; Dandekar *et al.*, 2002 ; Tkaczuk-Włach *et al.*, 2002). Dans le premier cas, la forte concentration en SOD permettrait une meilleure protection des gamètes chez les hommes fertiles et son déficit chez les hommes infertiles serait la cause des dommages et de la perte de fonction des spermatozoïdes. Dans le deuxième cas, l'augmentation de l'activité SOD chez les hommes infertiles serait la conséquence du stress oxydant présent dans leur tractus génital et serait donc une tentative infructueuse de protéger les spermatozoïdes. Les deux hypothèses semblent plausibles et les divergences des résultats tiennent peut-être seulement au fait que les mêmes symptômes (oligozoospermie, asthénozoospermie...) peuvent avoir une origine différente. Ainsi, selon l'échantillonnage des hommes infertiles, la variation globale de l'expression de SOD par le tractus génital serait différente dans chaque étude.

➤ *La catalase*

L' H_2O_2 produit par la dismutation de $\text{O}_2^{\bullet -}$ est plus réactif. Il peut réagir avec plusieurs composants de la cellule et conduire à la formation d'EOR encore plus réactifs. Il doit donc être rapidement éliminé lorsqu'il atteint une concentration trop importante. L'une des enzymes chargées de ce travail est la catalase. C'est une protéine ubiquitaire tétramérique qui est située dans le peroxysome et le cytosol des cellules et dont chaque monomère est étroitement lié à un hème (molécule organique comportant du fer en son centre). Ce sont ces hèmes qui vont conférer son activité enzymatique à la catalase (figure 54). Ainsi, H_2O_2 va réagir avec le fer au centre de l'hème, libérant de l'eau et liant un oxygène au fer. La réaction d'une deuxième molécule d' H_2O_2 avec l'hème oxydé va permettre de régénérer l'hème en libérant de l' H_2O et de l' O_2 . La réaction catalysée par la catalase est donc la suivante :



Cette enzyme est très rapide grâce à ces 4 hèmes qui s'auto-régénèrent à chaque réaction avec deux H_2O_2 . Ainsi, une catalase peut dismuter plusieurs millions d' H_2O_2 en une seconde. Cette enzyme est donc particulièrement adaptée en cas de stress oxydant majeur. Il s'agit d'une enzyme de stress par excellence car son activité est inhibée tant que la concentration en H_2O_2 n'atteint pas un certain seuil situé bien au-dessus des conditions physiologiques (Cohen & Hochstein, 1963).

Comme pour la SOD, plusieurs travaux ont essayé de vérifier s'il existait un lien entre l'activité de la catalase et l'infertilité. Certains d'entre eux ne montrent aucune variation de l'activité de la catalase dans le plasma séminal entre les hommes fertiles et infertiles (Zini *et al.*, 2000 ; Dandekar *et al.*, 2002). Plusieurs autres rapports font cependant état d'une baisse de l'activité de la catalase dans le plasma séminal des patients infertiles par rapports aux hommes fertiles (Jeulin *et al.*, 1989 ; Zelen *et al.*, 2010 ; Ramya *et al.*, 2011 ; Atig *et al.*, 2013). L'une des études montre cependant que seuls les patients infertiles avec des paramètres spermatiques anormaux présentent une baisse de l'activité de la catalase. Ainsi, les patients infertiles avec une normospermie ou une leucocytoospermie sans perte de mobilité des gamètes possèdent une activité de la catalase similaire à celle des hommes fertiles (Ramya *et al.*, 2011). Que ce soit chez les hommes fertiles ou chez les hommes infertiles, cette corrélation entre l'activité de la catalase dans le plasma séminal et les paramètres spermatiques (morphologie, viabilité) semble toujours se vérifier (Shamsi *et al.*, 2010).

Type de GPx	Résidu oxydant	Homo-tétramère	Substrat réducteur	Substrat oxydant
GPx1	Sec	Oui	GSH	H ₂ O ₂ , LOOH soluble, ROOH, peroxydrite
GPx2	Sec	Oui	n.d.	n.d.
GPx3	Sec	Oui	GSH ; Faible activité avec Trx et Grx	H ₂ O ₂ , LOOH soluble, ROOH, PLOOH
GPx4	Sec	Non	GSH, DTT, mercaptoéthanol, cystéine, thiols des protéines	H ₂ O ₂ , LOOH, ROOH, PLOOH, ChOOH, CEOOH, peroxydrite
GPx5	Cys	Non	n.d.	n.d.
GPx6	Sec (homme), Cys (rats, souris)	Oui	n.d.	n.d.
GPx7	Cys	Non	GSH, PDI	H ₂ O ₂
GPx8	Cys	Non	GSH, PDI ?	H ₂ O ₂

Tableau 5 : Les glutathion peroxydases des mammifères

ChOOH, cholestérol hydroperoxydé ; CEOOH, ester de cholestérol hydroperoxydé ; DTT, dithiothréitol ; Grx, glutarédoxine ; LOOH, lipide hydroperoxydé (acide gras); PLOOH, phospholipide hydroperoxydé de différentes classes; ROOH, petits hydroperoxydes synthétiques (e.g. cumène hydroperoxydé et hydroperoxyde de tert-butyl); Trx, thiorédoxine; PDI, *protein disulfide isomerase*; n.d. non déterminé actuellement (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013).

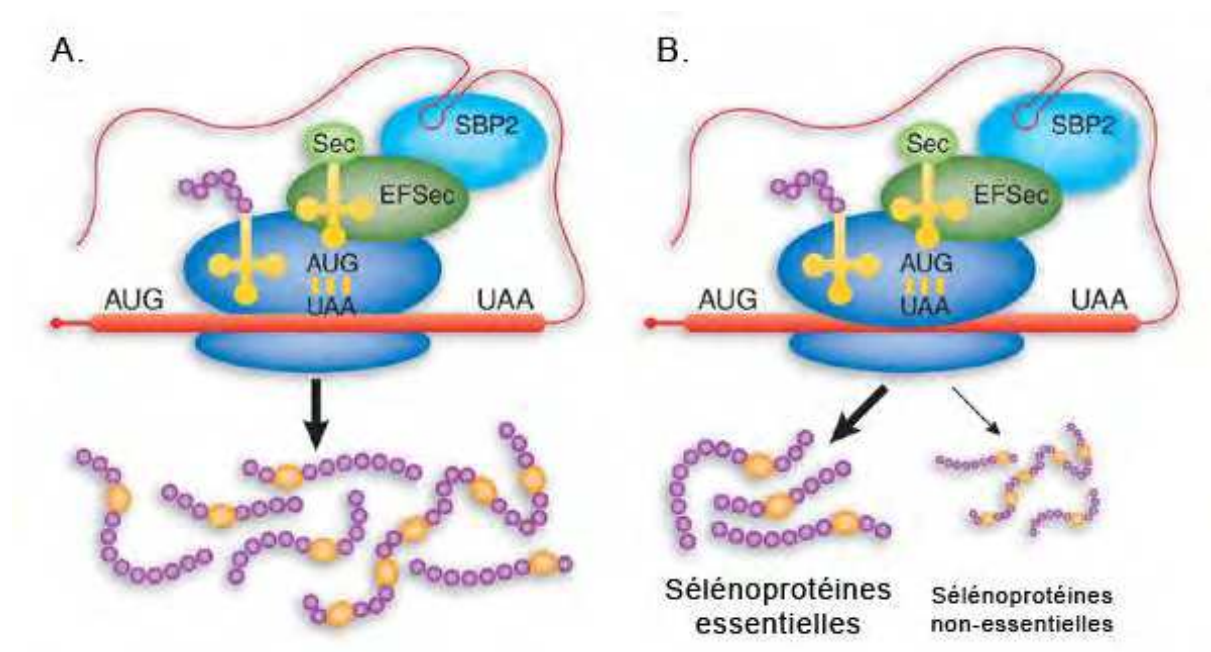
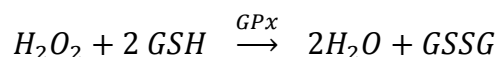


Figure 55 : L'insertion de la sélénocystéine

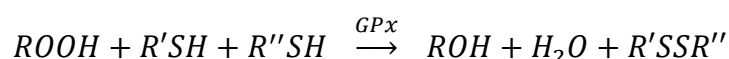
La synthèse des sélénoprotéines est dépendante de la concentration en Se : si le Se est disponible, toutes les sélénoprotéines sont produites sans restriction ; tandis qu'en cas de carence en Se, la synthèse des sélénoprotéines est réduite et sélective (Berry, 2005).

➤ Les glutathion peroxydases

L' H_2O_2 peut également être éliminé par l'action d'une famille d'enzyme appelée glutathion peroxydase (GPx, tableau 5). Ces enzymes transforment l' H_2O_2 en H_2O par un mécanisme différent de celui de la catalase, nécessitant l'utilisation d'un donneur d'électron tel que le glutathion (GSH). Ces enzymes peuvent donc réaliser la réaction suivante :



Des données complémentaires ont cependant permis de déterminer que l' H_2O_2 n'est pas le seul et unique substrat de ces enzymes. Plusieurs d'entre elles sont en effet capables de réduire différents composés organiques hydroperoxydés (ROOH) comme des lipides, des bases azotées... De plus, les membres de cette famille n'utilisent pas tous uniquement le GSH comme donneur d'électron. Certains ont même une grande affinité pour les thiorédoxines et les glutarédoxines et la mGPx4 peut utiliser les thiols des protéines environnantes, comme lors de la maturation du flagelle des spermatozoïdes (Toppo *et al.*, 2009 ; Burk & Hill, 2010). Ainsi, le nom de « glutathion » peroxydases ne serait pas forcément le plus approprié et la réaction catalysée serait la suivante :



Les GPx ont d'abord été considérées comme des sélénoprotéines car les premiers membres découverts comportaient tous dans leur site actif une sélénocystéine (Secys ou U) à l'origine de leur capacité à réduire l' H_2O_2 . Cependant, la recherche dans les bases de données d'autres membres de cette famille par homologie de séquence a permis de découvrir des GPx comportant une cystéine (Cys) en lieu et place de la Secys. A l'heure actuelle, les GPx des mammifères et autres vertébrés sont au nombre de huit. Chez les mammifères, les GPx1 à 4 possèdent une Secys et sont dites « séléno-dépendantes ». Les GPx5, 7 et 8 possèdent une Cys et sont « séléno-indépendantes ». Pour finir, GPx6 est séléno-dépendante ou -indépendante en fonction des espèces.

La synthèse des GPx séléno-dépendantes et des sélénoprotéines en général est particulière. En effet, il n'existe pas de codon spécifique pour ordonner l'insertion de la Secys dans la chaîne polypeptidique. Le codon de la Secys est UGA qui est aussi un codon « Stop ». Lors de la traduction de l'ARNm en protéine, le codon UGA permet l'insertion d'une Secys uniquement si l'ARNm comporte une structure spécifique de type tige-boucle dans sa partie 3'-UTR. La séquence permettant la formation de cette structure est appelée SECIS (*Secys insertion sequence*). Elle est reconnue par une protéine appelée *SECIS binding protein 2* (SBP2) qui va servir d'intermédiaire entre le ribosome et l'élément SECIS (figure 55A). Lorsque ces trois acteurs sont liés ensemble, l'ARNt^{Secys} portant la Secys est apportée par un facteur d'élongation spécifique, eEFSecys (*Secys specific elongation factor*), au moment de la lecture du codon UGA, permettant l'insertion d'une Secys dans le polypeptide (Donovan & Copeland, 2010).

L'expression des GPx varie selon les tissus et les espèces. Pour plusieurs GPx, la régulation de cette expression est soumise à des facteurs environnementaux incluant la disponibilité en sélénium, la pression en oxygène des cellules et la concentration en EOR. Ainsi, l'absence de sélénium provoque une absence en Secys et en Secys-ARNt^{Secys}. Le codon UGA, malgré la présence de l'élément SECIS et des protéines adéquates, sera traduit comme un codon « Stop » lors de la

traduction de l'ARNm d'une sélénoprotéine, entraînant une absence de protéine fonctionnelle. Cependant, il faut noter que lors d'une déficience en sélénium, une hiérarchie se met en place au sein des GPx (figure 55B). En effet, GPx1 n'est très vite plus produite alors que GPx2 et GPx4 continuent à l'être (GPx2>GPx4>GPx3>GPx1). Ceci serait dû à une instabilité plus importante des ARNm GPx1 lors d'un déficit en Se (Brigelius-Flohé, 2006). Quant à la régulation par la concentration en oxygène ou en EOR, elle est effectuée *via* des voies de signalisation activant des éléments de réponse situés dans le promoteur de ces gènes. Plusieurs gènes codant pour des GPx sont ainsi activés par le facteur de transcription NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), impliqué dans l'activation de différents systèmes de protection antioxydante.

- GPx1

Le premier membre de cette famille qui ait été découvert est GPx1 (ou *cytosolic GPx*, cGPx). Il s'agit d'une enzyme homotétramérique séléno-dépendante. Elle se situe dans le cytosol et la mitochondrie. Elle séquestre 50 % de la totalité du Se présent dans le foie. Ses substrats sont l'H₂O₂ et d'autres hydroperoxydes solubles de faibles masses moléculaires. Par exemple, elle ne peut pas réduire les phospholipides peroxydés mais elle peut réduire les acides gras hydroperoxydés qui ont été clivés sur des phospholipides. GPx1 est le membre des GPx qui a le plus d'affinité avec le GSH et qui l'utilise de façon quasi exclusive (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013). L'invalidation du gène *gpx1* chez la souris n'est pas létale et ces souris restent en bonne santé, tant qu'elles ne sont pas soumises à un stress oxydant majeur générateur de O₂^{•-}, qui leur sera fatal. Cependant, de façon étonnante, l'invalidation de *gpx1* rend les souris plus résistante à un excès de NO[•] et une surexpression de GPx1 provoque une obésité et une résistance à l'insuline et à la leptine en perturbant les voies de signalisation induites par l'insuline (Haan *et al.*, 1998 ; Lei & Cheng, 2005). Dans le tractus génital, GPx1 est exprimé dans le cytoplasme de toutes les cellules bordant la lumière des tubules.

- GPx2

La protéine GPx2 (ou *gastrointestinal GPx*, GI-GPx) est elle aussi un homotétramère séléno-dépendant. GPx2 n'ayant pas été purifiée, ses substrats ne sont pas connus. Cependant, les résidus qui sont supposés intervenir dans la fixation du GSH chez GPx1 sont peu modifiés chez GPx2. Les biochimistes supposent donc que l'affinité de GPx2 avec le GSH est élevée. C'est une protéine cytosolique majoritairement exprimée dans le système digestif et plus particulièrement dans le tractus intestinal (Chu *et al.*, 1993) où elle semble jouer un rôle important dans le maintien de l'intégrité du tissu (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013). Récemment, l'expression de GPx2 a été observée lors du développement embryonnaire, à la fois dans les tissus extra-embryonnaires, où son expression est la plus forte, et dans plusieurs organes de l'embryon (cœur, foie, système nerveux central, peau...) à différents moments du développement précoce (Baek *et al.*, 2011).

- GPx3

GPx3 (ou *plasma GPx*, pGPx) est une protéine homotétramérique glycosylée. Elle est capable de réduire l'H₂O₂ et les hydroperoxydes solubles dont les acides gras hydroperoxydés. GPx3 peut utiliser le GSH comme donneur d'électron, ainsi que les thiorédoxines et les glutarédoxines. Elle est sécrétée principalement par le rein et l'épididyme (Schwaab *et al.*, 1998, 18 % par rapport au rein), bien que d'autres tissus l'expriment également (tissu adipeux, muscles,

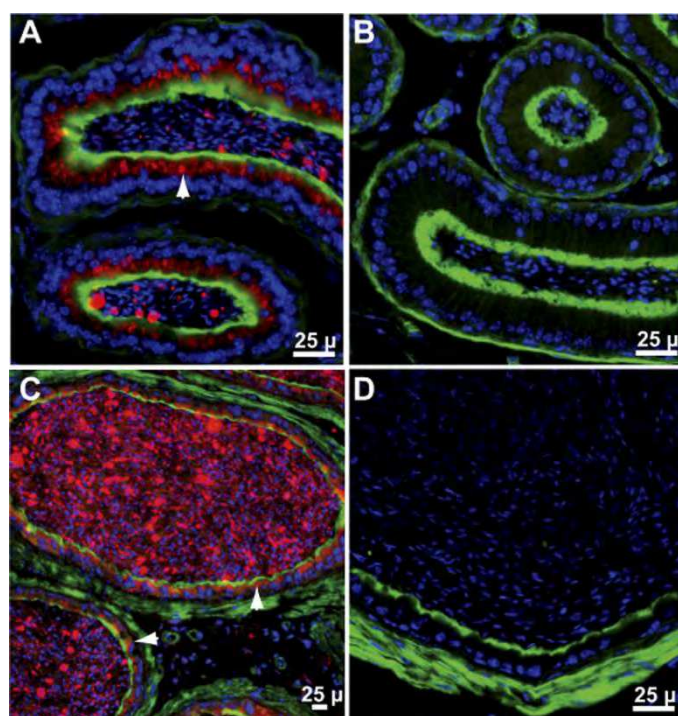


Figure 56 : La localisation de GPx3 dans l'épididyme

Cette immunohistochimie présente la localisation de GPx3 dans l'épididyme de souris sauvages (A, tête distale de l'épididyme ; C, queue de l'épididyme) et de souris invalidées pour GPx3 (B, tête distale de l'épididyme ; D, queue de l'épididyme 2 semaines après transplantation d'un rein de souris *gpox3*^{-/-}). Le marquage de GPx3 est en rouge, de l'actine en vert et du noyau en bleu (Burk *et al.*, 2011).

poumons, cœur). Elle est retrouvée dans le plasma sanguin, l'espace interstitiel entre les acini mammaires et le lait. Elle a aussi été retrouvée fixée à la membrane basale d'un certain nombre d'épithélia chez la souris, dont ceux du tractus gastro-intestinal, des poumons, des tubules efférents du tractus génital mâle. Des travaux récents ont indiqués que l'origine de ces GPx3 fixées sur certaines membranes basales serait sanguine. Au niveau de l'épididyme murin, nos travaux antérieurs n'ont pas montré de sécrétion de GPx3, en accord avec l'expression majoritaire d'un transcrit alternatif dépourvu des séquences codantes pour le signal peptidique de sécrétion (Schwaab *et al.*, 1998). Néanmoins une faible proportion de GPx3, essentiellement au niveau de la région proximale de la tête de l'épididyme serait sécrétée (Schwaab *et al.*, 1998). Des travaux plus récents ont confirmé cette sécrétion épididymaire de GPx3 (Burk *et al.*, 2011) (figure 56). A l'heure actuelle, la fonction de cette enzyme est encore discutée, d'autant que sa concentration sanguine semble trop faible pour pouvoir être efficace. L'invalidation de *gp3* chez la souris ne présente qu'un léger phénotype de susceptibilité à la thrombose (Jin *et al.*, 2011).

- GPx4

L'enzyme GPx4 (ou *phospholipid hydroperoxide GPx*, PHGPx) est une sélénoprotéine monomérique qui existe sous trois isoformes : cytosolique (cGPx4), mitochondriale (mGPx4) et nucléaire (snGPx4). Les formes cytosolique et mitochondriale diffèrent uniquement par leur localisation subcellulaire, tandis que la forme nucléaire est plus grande. De plus, cGPx4 est ubiquiste, mGPx4 est principalement exprimée par les cellules germinales mâles en spermiogenèse et snGPx4 est localisée uniquement dans le noyau des spermatozoïdes à partir de la spermiogenèse. Ces trois isoformes sont les produits du même gène. Celui-ci comporte 7 exons qui codent pour cGPx4 et mGPx4, ainsi qu'un exon alternatif (Ea) dans le premier intron qui sera transcrit à partir d'un site d'initiation alternatif excluant le premier exon pour permettre la production de snGPx4.

Quelle que soit l'isoforme, GPx4 utilise comme substrat l'H₂O₂, les petits hydroperoxydes solubles et, contrairement aux autres GPx, les stérols hydroperoxydés et les phospholipides hydroperoxydés sans qu'ils aient besoin d'être clivés. Elle peut par ailleurs catalyser cette réaction même si ces lipides sont insérés dans une membrane. GPx4 a également comme substrat le GSH et les thiols des protéines voisines, mais pas les thiorédoxines.

L'invalidation complète des trois isoformes de GPx4 est létale pour l'embryon entre 7,5 et 8,5 *dpc*, indiquant l'importance de GPx4 lors de la phase de gastrulation du développement embryonnaire. De plus, les cellules fibroblastiques dérivées d'embryons *gp4^{+/-}* sont plus sensibles au stress oxydant que ces mêmes cellules provenant d'embryons sauvages (Yant *et al.*, 2003). Les phénotypes observés lors de l'invalidation sélective des isoformes mGPx4 ou snGPx4 (cf. § La participation des EOR au pontage disulfure) laissent penser que c'est l'invalidation de l'isoforme cGPx4 qui est à l'origine de ce phénotype de létalité. En effet, aucune des deux autres isoformes n'est essentielle au développement embryonnaire. Leur invalidation sélective est uniquement associée à des défauts de la pièce intermédiaire du flagelle (mGPx4) et de la chromatine (snGPx4) des spermatozoïdes.

Une invalidation du gène *gp4* restreinte aux spermatocytes a été générée grâce à un système Cre-loxP chez des souris possédant le gène de la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur de *pgk-2* (phosphoglycerate kinase-2) (Imai *et al.*, 2009). Ses souris mâles n'exprimant aucune des trois isoformes de GPx4 dans les spermatocytes, présentent une infertilité *in vivo* et *in vitro*, associée

à une grande diminution du nombre des spermatozoïdes produits et à de sévères défauts morphologiques du flagelle des quelques gamètes présents dans la queue de l'épididyme, générant une faible mobilité progressive. Ces gamètes possèdent également des mitochondries dont la morphologie interne et la fonctionnalité sont altérées uniquement après une incubation *in vitro* dans du milieu de conservation. Des analyses poussées des spermatozoïdes de ces souris ont montré que la diminution de la production de gamètes est due à une apoptose de nombreuses spermatogonies avant la naissance, peut-être à cause d'un stress oxydant accru dans ces cellules en absence de GPx4. Par ailleurs, les défauts fonctionnels des mitochondries ne sont pas à l'origine des anomalies du flagelle. Ces dernières ne sont pas présentes dans les testicules : la structure en « épingle à cheveux » du flagelle n'apparaît que progressivement lors de la descente épидидymaire des gamètes. Ce phénomène pourrait être dû à l'absence de mGPx4 et donc à un défaut de formation de la capsule mitochondriale dans la pièce intermédiaire. D'autre part, la perte de potentiel de la membrane mitochondriale dans les spermatozoïdes de ces souris, observée lors d'une incubation *in vitro* des gamètes, est inhibée par l'ajout d'un excès de vitamine E dans le milieu, ce qui suggère fortement que la perte de fonction des mitochondries est causée par un stress oxydant, dû à l'absence de GPx4 (Imai *et al.*, 2009). Auparavant, la même équipe de recherche avait montré que 30 % des individus d'un groupe d'hommes infertiles montrant une oligoasthénozoospermie présentaient une diminution significative de l'expression GPx4 dans leurs spermatozoïdes (Imai *et al.*, 2001). Les résultats de l'étude de ce modèle murin prouvent donc que la diminution de l'expression de GPx4 dans les gamètes est à l'origine de l'infertilité de ces patients et pas une conséquence d'un autre défaut présent dans le tractus génital.

- GPx5

La protéine GPx5 est dimérique, glycosylée et ne comporte pas de sélénocystéine. Il s'agit d'une protéine sécrétée qui présente une homologie importante avec GPx3. Elle n'a pas fait l'objet pour l'instant d'études biochimiques à partir de la protéine purifiée permettant de déterminer quels sont ses substrats exacts, bien que l'H₂O₂ semble être un d'entre eux (Vernet *et al.*, 1996). Étant exprimée principalement par l'épithélium épидидymaire, elle a été appelée *epididymal secretory GPx*. Mais il semblerait qu'elle soit aussi exprimée faiblement par quelques autres tissus comme le testicule, le canal déférent, le tissu adipeux blanc et le cerveau.

Dans l'épididyme, l'expression du gène *gp5* est sous le contrôle des androgènes et de facteurs testiculaires (Drevet *et al.*, 1998 ; Kolasa *et al.*, 2008). Chez la souris, ce gène comporte 5 exons et 4 introns et permet la production de différents transcrits, correspondants à différentes isoformes de la protéine (Zhang *et al.*, 2008). La protéine est produite au niveau de la tête de l'épididyme et sécrétée dans le fluide épидидymaire au contact des spermatozoïdes. Elle va s'accumuler dans le fluide tout au long du transit des gamètes dans la tête de l'épididyme. Une grande partie de GPx5 va s'associer à la membrane plasmique de la tête des spermatozoïdes, tandis qu'une autre partie restera circulante sous forme libre ou associée à des vésicules lipidiques et ceci jusque dans le tractus génital féminin (Rejraji *et al.*, 2002).

La fonction de cette enzyme a d'abord été étudiée *ex vivo* grâce à des cellules transfectées, exprimant de façon stable la GPx5 murine. Ces cellules ont montré une meilleure résistance à un traitement par l'H₂O₂ que les cellules non transfectées (Vernet *et al.*, 1996), attestant du rôle de l'enzyme GPx5 dans l'élimination d'H₂O₂. De plus, nous avons montré que des souris soumises à

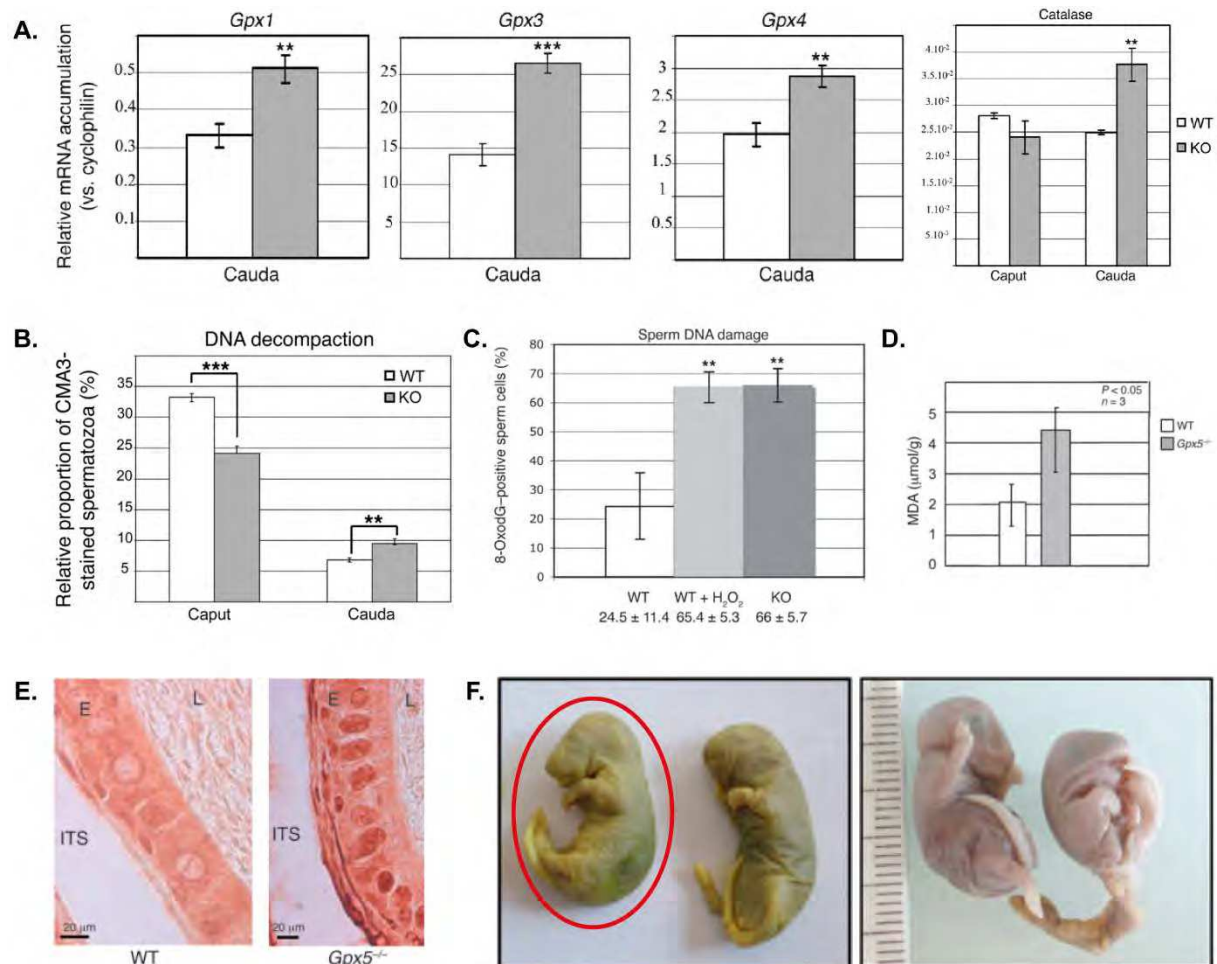


Figure 57 : Le phénotype des souris *gpx5*^{-/-}

Les souris *gpx5*^{-/-} présentent une augmentation de l'expression des autres GPx épидидymaires (1, 3, 4) et de la catalase dans la queue de l'épididyme, signe d'une augmentation de la concentration en EOR (A). Les spermatozoïdes de ces souris montrent une augmentation de la condensation de la chromatine dans la tête de l'épididyme et, à l'inverse, une diminution de cette condensation dans la queue de l'épididyme (B). De plus, les spermatozoïdes présentent une oxydation de l'ADN (C) et des lipides (D) plus importante que chez les souris sauvages. Cette augmentation de l'oxydation est également visible dans l'épithélium de la queue de l'épididyme, comme le montre cette immunohistodétection du 8-OHdG (E). L'ensemble de ces dommages oxydants dans l'épididyme des souris *gpx5*^{-/-} a des conséquences sur leur descendance, puisqu'une augmentation des malformations fœtales a été observée lors des croisements de souris âgées de plus d'un an. Certaines de ces malformations sont visibles sur les photographies en F, où un embryon normal est entouré en rouge (Chabory *et al.*, 2009).

un régime sans sélénium, dont on sait qu'il inhibe fortement l'activité des GPx séléno-dépendantes, n'arboraient qu'une faible diminution de l'activité GPx et peu de peroxydation lipidique dans l'épididyme, contrairement aux autres organes (foie, rein). Ceci est en fait expliqué par l'augmentation de l'expression de la protéine GPx5 dans l'épididyme, observée chez les animaux carencés en Se (Vernet *et al.*, 1999). Ainsi, GPx5 semble capable de limiter les dommages oxydants, tant *in vitro* qu'*in vivo*.

Par la suite, notre équipe a généré des souris C57Bl6 mutantes chez lesquelles le gène *gpx5* a été invalidé (figure 57) (Chabory *et al.*, 2009). Les souris mâles *gpx5*^{-/-}, lorsqu'ils sont croisés avec des souris femelles sauvages de 2 mois de fertilité prouvée, montrent une diminution de la fertilité. En effet, une augmentation de la mortalité périnatale, des avortements prématurés et des anomalies de développement ont pu être observés. L'analyse des spermatozoïdes de souris *gpx5*^{-/-} n'a montré aucune altération structurale, mais la chromatine spermatique des souris *gpx5*^{-/-} âgées présente des défauts de condensation avec une compaction accrue dans la tête de l'épididyme et diminuée dans la queue de l'épididyme. Ces défauts de la chromatine spermatique sont associés à une augmentation des dommages oxydants des gamètes et de l'épithélium épididymaire (oxydation de l'ADN, peroxydation lipidique) dès l'âge de 6 mois. Dans la queue de l'épididyme des souris *gpx5*^{-/-}, une augmentation de l'activité enzymatique glutathion peroxydase globale a été observée. Ceci est dû à une augmentation de l'expression des GPx1, 3 et 4 également exprimées dans l'épididyme. De plus, une augmentation de l'expression de la catalase est également observée. Ainsi, la perte de GPx5 dans la lumière de l'épididyme semble provoquer un stress oxydant important, probablement dû à un défaut de recyclage de l'H₂O₂, que l'épithélium tente de diminuer en augmentant la production des autres enzymes antioxydantes locales à sa disposition. Cependant, cette compensation ne semble pas suffisante pour protéger les gamètes en transit, qui présentent un ADN plus oxydé que chez les souris sauvages. Ces dommages à l'ADN, comme nous l'avons vu, peuvent être à l'origine de mutations lors de la réparation de l'ADN paternel par l'ovocyte après la fécondation. Ceci pourrait expliquer pourquoi les souriceaux des mâles *gpx5*^{-/-} présentent une plus grande mortalité périnatale et des problèmes de développement embryonnaire accrus. Le fait que cette diminution de la fertilité et cette augmentation des défauts de la chromatine ne soient visibles qu'à partir d'un certain âge est probablement à relier au constat que les capacités antioxydantes des cellules et de l'organisme en général diminuent avec le vieillissement, limitant ainsi la compensation de la perte de GPx5.

- GPx6

GPx6 est une enzyme homotétramérique qui semble être sécrétée au vu du signal peptidique découvert par une analyse *in silico*. Chez l'Homme et le cochon, GPx6 est une protéine séléno-dépendante, alors que, chez la souris et le rat, la Secys est remplacée par une Cys. Le gène *gpx6* murin semble cependant présenter une séquence SECIS « fossile » non-fonctionnelle dans la partie 3'UTR (Kryukov *et al.*, 2003).

GPx6 est exprimée chez l'embryon (Kryukov *et al.*, 2003) et dans les glandes de Bowman (Dear *et al.*, 1991), qui sont situées dans l'épithélium olfactif au fond des fosses nasales. Aucune donnée n'existe actuellement sur les possibles substrats de GPx6, car elle n'a jamais été purifiée. Aucune fonction ne lui a été attribuée pour l'instant.

- GPx7 et GPx8

GPx7 et GPx8 sont deux protéines séléno-indépendantes et monomériques. Leurs séquences sont proches de GPx4. Ces deux enzymes sont localisées dans le réticulum endoplasmique (RE) des cellules (figure 58), même si des études *in silico* les prédisaient comme sécrétées. GPx7 est dans la lumière du RE, tandis que GPx8 est transmembranaire. Elles seraient impliquées dans la formation de ponts disulfures lors de la phase de repliement des protéines. L'action conjuguée des deux GPx, de PDI et du GSH augmenterait de façon importante la vitesse de formation des ponts disulfures dans les protéines en maturation en régénérant plus vite le site actif de PDI (Nguyen *et al.*, 2011).

➤ **Les peroxyrédoxines**

Les peroxyrédoxines (Prx) sont des enzymes antioxydantes capables de réduire des peroxydes tels que l' H_2O_2 , les lipides hydroperoxydés et l' ONOO^- . Ces protéines sont codées par les gènes *prdx*. Les membres de cette famille de protéines sont au nombre de six chez les mammifères.

Les Prx1 à 4 possèdent deux résidus Cys séparés par plus de 100 acides aminés et agissent sous forme d'homodimères. La réduction de deux peroxydes oxyde une Cys sur chaque monomère (figure 59A). Les Cys oxydées vont alors chacune former un pont disulfure avec la Cys conservée de l'autre sous-unité. Les deux ponts disulfures intermoléculaires seront alors réduits par des thiorédoxines afin de régénérer les deux monomères de Prx, qui seront alors prêts à réaliser un nouveau cycle de réduction des peroxydes (figure 59A). Les Prx1 et 2 sont cytosoliques et nucléaires, alors que Prx3 est mitochondriale et que Prx4 est sécrétée ou se situe dans le réticulum endoplasmique des cellules.

Prx5 est localisée dans le cytosol, les mitochondries et les peroxysomes. Bien que formant également un homodimère dont chaque monomère contient deux Cys, son mécanisme catalytique varie légèrement. En effet, les deux ponts disulfures formés lors de la réaction de réduction des peroxydes se forment entre les Cys d'un même monomère et non entre les sous-unités (figure 59B). Sa régénération est cependant réalisée par les thiorédoxines également.

La dernière peroxyrédoxine, Prx6, est plus particulière encore : elle ne contient qu'une seule Cys par monomère et sa régénération est dépendante de la GSH et des glutathion transférases (GST) et non des thiorédoxines (figure 59C). Elle a ainsi d'abord été considérée comme une GPx indépendante du Se. Prx6 possède également une autre particularité : elle présente une activité phospholipase indépendante du Ca^{2+} .

Les Prx sont présentes à la fois dans les spermatozoïdes et le plasma séminal chez l'homme et les rongeurs. Leur concentration dans le plasma séminal est même très élevée, laissant supposer un rôle probablement très important dans la protection des spermatozoïdes lors de leur transit dans les voies génitales femelles (Manandhar *et al.*, 2009 ; O'Flaherty & Souza, 2011). Prx4, lors de la spermiogenèse des rats, existe sous une forme liée à la membrane du réticulum endoplasmique (absente chez le spermatozoïde mature) et a été proposée comme intervenant dans la formation de l'acrosome (Sasagawa *et al.*, 2001). L'invalidation du gène *prdx4* chez la souris a par ailleurs montré que Prx4 joue un rôle dans le tractus génital mâle. Ces souris présentent une atrophie testiculaire

et les cellules germinales *prdx4*^{-/-} possèdent plus de dommages oxydants, à la fois sur l'ADN et sur les lipides essentiellement membranaires. Dans la queue de l'épididyme de ces souris, la présence anormale de spermatides rondes a été retrouvée. De plus, le nombre de spermatozoïdes produits est faible par rapport aux souris sauvages. Cependant, les spermatozoïdes épididymaires des animaux *prdx4*^{-/-} ont des capacités fécondantes normales en FIV (Tuchi *et al.*, 2009).

➤ **Les thiorédoxines**

Les thiorédoxines (Trx) sont de petites protéines ubiquitaires codées par des gènes *txn* qui jouent différents rôles dans les cellules : réductases antioxydantes, régulateurs de l'apoptose, facteurs de croissance, modulateurs de l'inflammation... Les Trx possèdent toutes un motif catalytique –Cys–Gly–Pro–Cys– localisé dans une structure tertiaire hautement conservée. Ce motif est situé à la surface de la protéine native. Les mammifères possèdent deux Trx : Trx1, de 12 kDa, qui est cytosolique et nucléaire, et Trx2, de 18 kDa, qui est mitochondriale.

Les Trx ont pour substrats des protéines oxydées comportant un pont disulfure, dont elles vont catalyser la réduction. Parmi ces substrats, nous en avons évoqué certains tels que les GPx et les Prx. Lors de la réaction, les Cys des Trx vont donner au substrat un électron sous forme d'hydrogène, ce qui va entraîner en retour la formation d'un pont disulfure entre les deux Cys de la Trx. La régénération des Trx oxydées comportant ce pont disulfure est réalisée par une sélénocoenzyme, la thiorédoxine réductase (TrxR), avec l'aide du NADPH. Ainsi, une Trx peut réaliser de nombreux cycles de réduction des protéines oxydées, qui à leur tour vont pouvoir réaliser de nombreux cycles de réduction des EOR.

Il est important de noter que les Trx appartiennent à la famille des protéines à domaine thiorédoxine (Txndc). Ces protéines comprennent un ou plusieurs domaines thiorédoxine de type –Cys–X–X–Cys– mais ne possèdent pas cette activité de régénération des enzymes antioxydantes comme les Trx1 et 2. Certaines d'entre-elles sont cependant importantes pour la maturation du spermatozoïde grâce à leur activité disulfide isomérase leur permettant de réaliser ou de déplacer des pontages disulfures au sein ou entre les protéines (cf. § La participation des EOR au pontage disulfure).

➤ **Les glutathion transférases**

Les glutathion transférases, appelées à l'origine glutathion S-transférase (GST), sont des enzymes connues pour leur rôle dans la détoxification des molécules nuisibles pour les cellules, qu'elles soient étrangères ou non à l'organisme. Les enzymes de cette superfamille sont organisées en trois différentes familles — les GST cytosoliques, microsomales et mitochondriales —, elles-mêmes subdivisées en plusieurs classes. Ainsi, chez les mammifères, les GST cytosoliques sont réparties en sept classes : alpha, mu, pi, sigma, thêta, oméga et zêta. Ce sont des protéines dimériques (homo- ou hétérodimériques) d'environ 200 à 250 acides aminés qui sont présentes pour la majeure partie dans le cytoplasme des cellules, bien que GSTA4 et GSTM1 peuvent être également retrouvées dans les mitochondries et les membranes. Les GST mitochondriales forment la classe kappa et fonctionnent elles aussi sous forme d'un dimère dans les mitochondries et les peroxysomes. On ne compte qu'une seule GSTK chez l'Homme, la souris et le rat. Les GST microsomales ou *membrane associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism* (MAPEG ou MGST) sont classées en quatre sous-groupes (I à IV), mais seuls les groupes I, II et IV sont

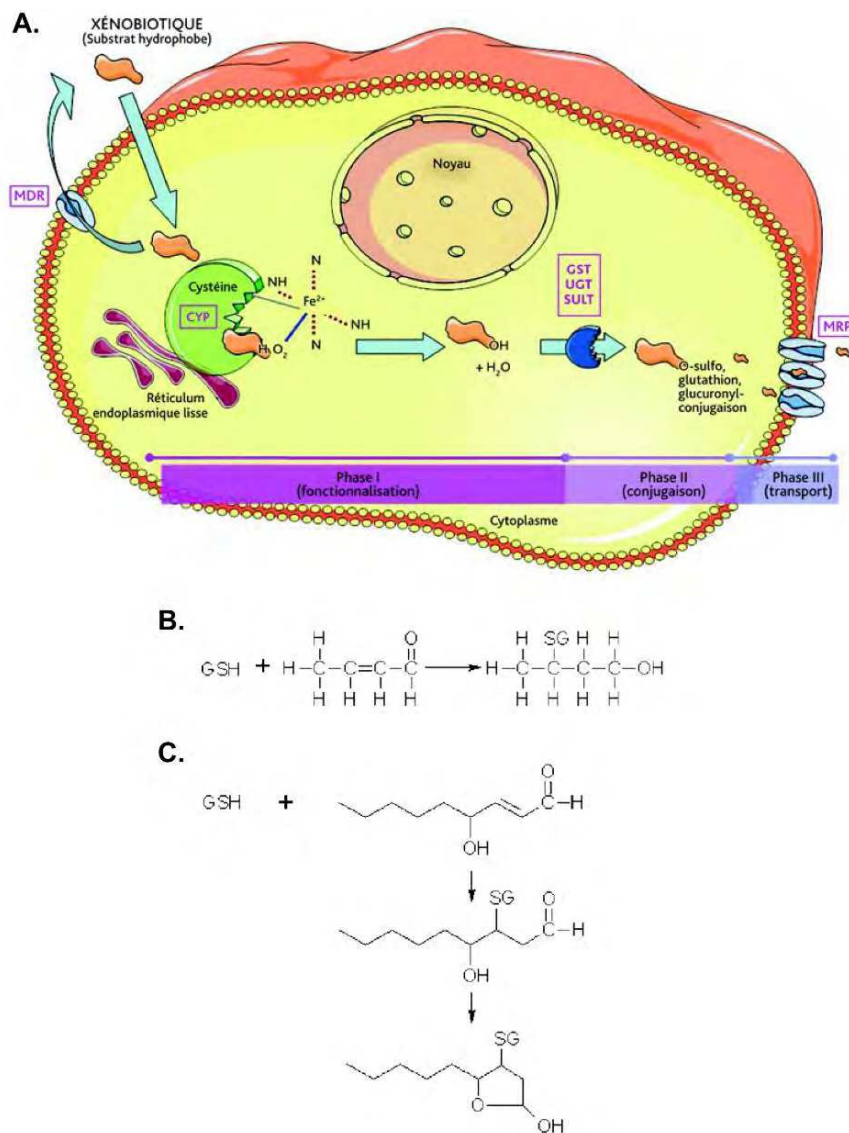


Figure 60 : L'action de détoxification des glutathion transférases

Les glutathion transférases (GST) sont impliquées dans la deuxième phase de la détoxification des molécules toxiques (A), en catalysant leur conjugaison avec le GSH, afin de permettre leur export hors des cellules par des canaux *multidrug resistance-associated proteins* (MRP) (Rouas & Gueguen, 2011). Parmi les substrats des GST se trouvent des produits de la peroxydation lipidique, comme le crotonaldéhyde (B) et le 4-HNE (C) (Hayes *et al.*, 2005). CYP : cytochrome P450 ; MDR : *multidrug resistance proteins* ; UGT : UDPglucuronosyl transférases ; SULT : sulfotransférases.

présents chez les mammifères. Ces GST ont la particularité d'être impliquées dans la formation d'eicosanoïdes tels que des leucotriènes et des prostaglandines (Hayes *et al.*, 2005). Le rôle antioxydant des GST passe par différentes actions. Leur activité la plus connue est la détoxification des molécules électrophiles par conjugaison avec du GSH (figure 60). Ainsi, les GST sont capables de neutraliser des toxines exogènes génératrices directes ou indirectes d'EOR (arsénique, lindane, aflatoxine...) et des produits de la peroxydation lipidique (4-HNE, crotonaldéhyde...). Ces produits conjugués au GSH seront par la suite évacués des cellules par des transporteurs de type ABC appartenant aux *multidrug resistance-associated proteins*. Les GST possèdent également une activité enzymatique modérée de type glutathion peroxydase, indépendante du Se. Elles sont donc capables de réduire certains lipides peroxydés (acides gras hydroperoxydés, esters de cholestérol hydroperoxydés, phospholipides hydroperoxydés), limitant ainsi la poursuite de la cascade de la peroxydation lipidique et la génération de produits toxiques tels que le 4-HNE et le MDA. Comme nous l'avons vu précédemment, les GST sont aussi indispensables à la régénération de la Prx6, capable de réduire les EOR et les lipides hydroperoxydés. Pour finir, en limitant la concentration en 4-HNE, qui régule certaines voies de signalisation (NF- κ B, JNK, PKC...), les GST agissent indirectement sur ces voies, inhibant par exemple l'apoptose (Sharma *et al.*, 2004 ; Hayes *et al.*, 2005). Dans le tractus génital mâle, les GST sont exprimées dans le testicule et sont présentes dans le plasma séminal et dans les spermatozoïdes chez l'homme, le rat, la souris et la chèvre. Par exemple chez le rat, GSTP1 est exprimé par les cellules de Sertoli et de Leidig, ainsi que par l'épithélium épидидymaire (Veri *et al.*, 1993), tandis que GSTM1, GSTM2 et GSTA3 sont exprimées par les cellules germinales (Rao & Shaha, 2000). Chez l'homme, de nombreuses GST sont exprimées dans le testicule (GSTA1, GSTA2, GSTM1, GSTM2, GSMT3, GSTP1) (Listowsky *et al.*, 1998) et la présence de GSTA1 et GSTP1 a été retrouvée dans le fluide séminal (Knapen *et al.*, 1999). Plusieurs travaux ont porté sur le polymorphisme des différents gènes codant pour les GST. Dans le cas de GSTM1, une mutation présente de façon homozygote chez environ 50 % des personnes de type caucasien entraîne une absence de protéine. Le génotype homozygote pour cet allèle nul a été corrélé à une plus grande susceptibilité aux maladies associées à un stress oxydant. Si l'homozygotie pour l'allèle nul ne semble pas avoir d'effet sur les paramètres spermatiques chez les hommes fertiles, elle est cependant corrélée à de moins bons paramètres spermatiques chez les hommes infertiles par rapport aux hommes infertiles exprimant GSTM1 (Aydemir *et al.*, 2007 ; Olshan *et al.*, 2010).

Les antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques que nous venons de passer en revue sont organisés en un ensemble complexe de réactions concertées (figure 61). Ces molécules semblent à première vue avoir des actions redondantes, possédant des substrats et des fonctions similaires. Cependant, les substrats, les mécanismes d'action et la localisation cellulaire et tissulaire spécifiques à chaque membre de chaque famille d'antioxydant permet une protection complète de tous les compartiments de chaque type cellulaire de chaque tissu, lors de circonstances parfois extrêmes, comme une carence en vitamines ou en sélénium. Ces différents acteurs de la protection antioxydante de l'organisme sont donc organisés de façon à optimiser le fonctionnement de chacun d'entre eux, en régénérant les molécules et le site actif des enzymes par exemple, et à pouvoir compenser, au moins partiellement, l'absence d'un ou de plusieurs d'entre eux.

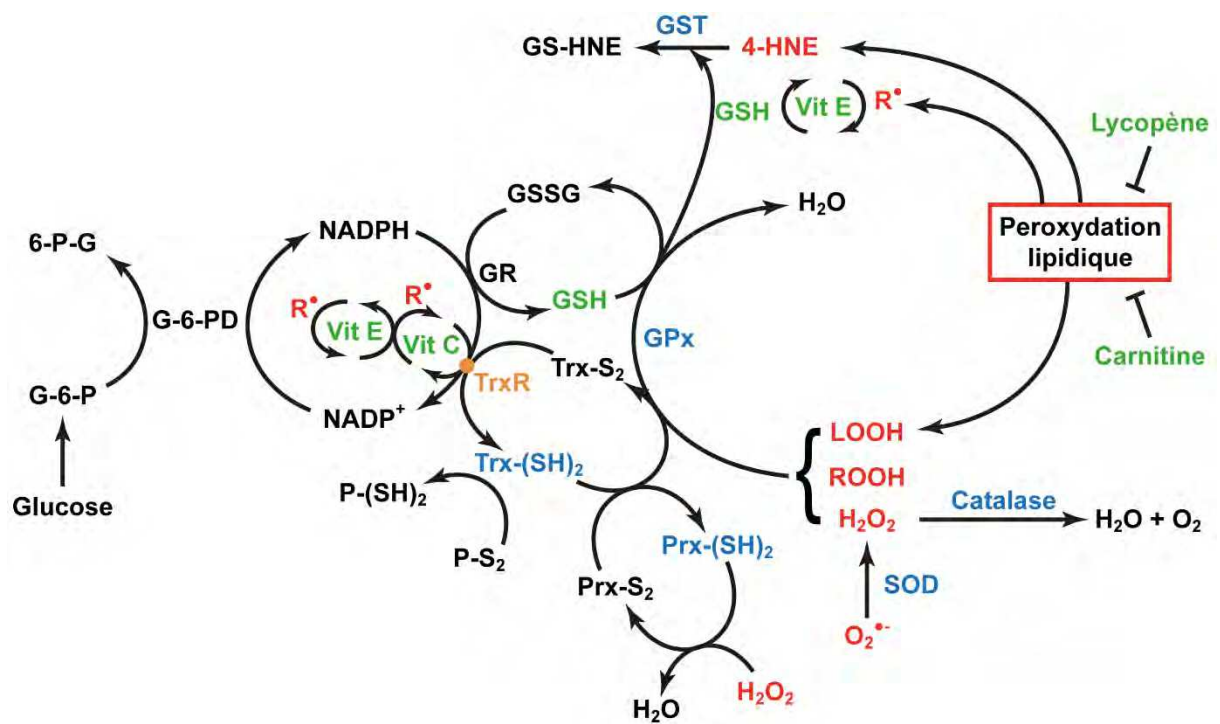


Figure 61 : Les interactions des molécules et des enzymes antioxydantes

Les molécules antioxydantes sont indiquées en vert, les enzymes antioxydantes réduites en bleu et les molécules oxydantes/oxydées en rouge. La TrxR régénère à la fois les thiorédoxines et la vitamine C. 4-HNE : 4-hydroxynonénal ; 6-P-G : 6-phosphoglucono-δ-lactone ; G-6-P : glucose-6-phosphate ; G-6-PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase ; GPx : glutathion peroxydase ; GSH/GSSG : glutathion réduit/oxydé ; GS-HNE : hydroxynonénal conjugué au GSH ; GST : glutathion transférase ; LOOH : lipide hydroperoxydé ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; P : protéine ; Prx : peroxyrédoxine ; R[•] : radical ; ROOH : molécule hydroperoxydée ; SOD : superoxyde dismutase ; TrxR : thiorédoxine réductase ; Vit : vitamine.

III. Les travaux de thèse

Dans l'épididyme, cet ensemble d'antioxydants maintient une concentration optimale en EOR, permettant la poursuite de la maturation des spermatozoïdes, sans pour autant les endommager. Ces molécules antioxydantes assurent ainsi la protection du patrimoine génétique paternel apporté par le spermatozoïde lors de la fécondation, ce matériel génétique étant nécessaire au bon déroulement du développement du nouvel individu.

Afin d'étudier *in vivo* la façon dont l'équilibre entre maturation des gamètes et élimination des EOR est maintenu, ainsi que l'importance de cet équilibre, des souris ne produisant pas les enzymes snGPx4 (assurant le pontage disulfure des protamines en présence d'H₂O₂ lors de la descente épидидymaire et contribuant à verrouiller la chromatine spermatique dans un état condensé) et GPx5 (recyclant l'H₂O₂ dans le fluide épидидymaire) ont été générées. L'un de mes objectifs a donc été de caractériser le phénotype de ces souris doublement invalidées.

Dans un second temps, dans le but d'appréhender plus finement l'étendue et la localisation des dommages oxydants sur le noyau spermatique, j'ai utilisé des approches immunocytochimiques afin de les visualiser dans le noyau spermatique, en relation avec les constituants chromatiniens. Une approche par séquençage à haut débit a ensuite été mise en place pour localiser les dommages oxydants à l'échelle chromosomique et génique.

Dans une perspective de développement clinique, j'ai ensuite testé une supplémentation orale antioxydante, du type de celles utilisées dans le cadre des procédures de procréation médicalement assistée, afin d'évaluer l'efficacité de cette approche thérapeutique pour diminuer les dommages oxydants gamétiques à l'origine de certaines infertilités masculines. [Cette partie du manuscrit est censurée pour des raisons de confidentialité.]

MATÉRIELS & MÉTHODES

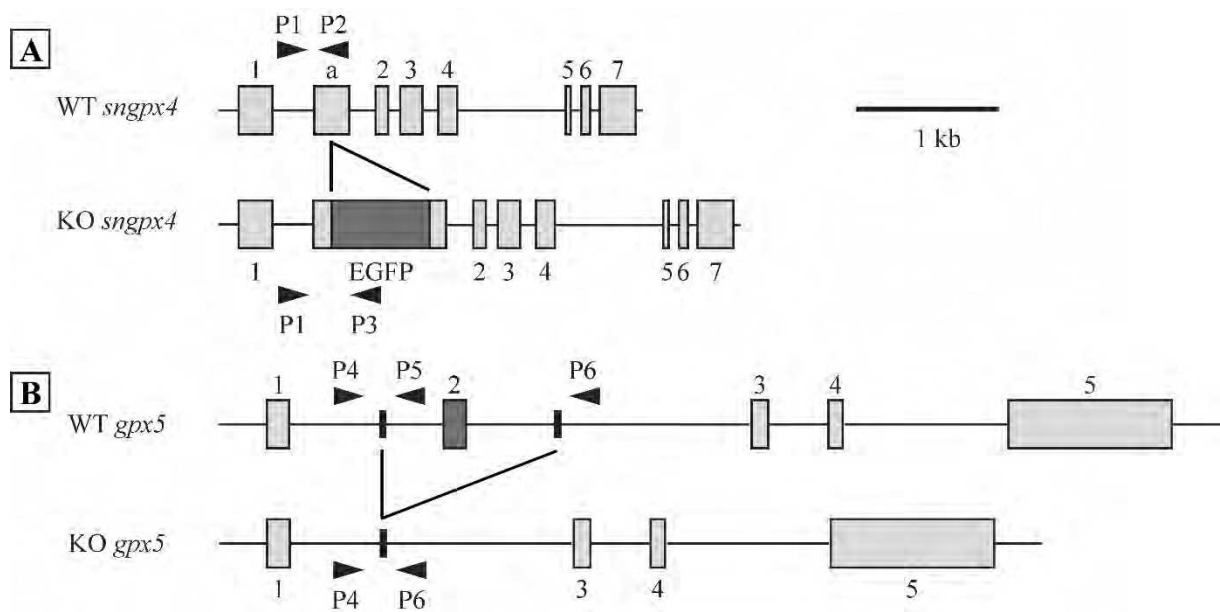


Figure 62 : L'organisation des allèles sauvages et invalidés des gènes codant pour snGPx4 et GPx5

Les deux gènes invalidés chez les souris DKO, *gpx4* (A) et *gpx5* (B), sont ici représentés à l'échelle. Les exons sont colorés en gris clair et les séquences ajoutées (A) ou excisées (B) en gris foncé. La position et le sens des amorces sont indiquées par des flèches sur chaque allèle de chaque gène.

I. Les animaux

1. Hébergement

Les souris utilisées lors de cette étude sont élevées en conditions environnementales contrôlées au sein d'une animalerie habilitée : la température ambiante est maintenue constante à 22°C et l'éclairage consiste en une alternance de périodes de lumière et d'obscurité de 12 heures. L'eau et la nourriture sont disponibles *ad libitum*. Elles sont nourries avec un régime d'entretien (Global diet, 2016, Harlan, Gannat, France), excepté les souris femelles gestantes et allaitantes (Global diet, 2018, Harlan, Gannat, France).

2. Modèles murins

Les expérimentations sont réalisées sur des souris de souches C57Bl/6 de quatre génotypes différents :

- sauvages (wild type, WT) ;
- *sngpx4*^{-/-}, invalidées pour l'isoforme spermatique nucléaire de GPx4 par insertion homozygote de la séquence du gène EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) dans l'exon alternatif Ea du gène *gpx4* (figure 62A) (Conrad *et al.*, 2005) ;
- *gpx5*^{-/-}, invalidées pour la protéine GPx5 par délétion homozygote de l'exon 2 du gène *gpx5* (figure 62B) (Chabory, 2009 ; Chabory *et al.*, 2009) ;
- *sngpx4;gpx5*^{-/-}, appelées « double *knock-out* » (DKO), invalidées pour les protéines snGPx4 et GPx5 par croisement des souris *sngpx4*^{-/-} et *gpx5*^{-/-}, jusqu'à l'obtention de souris homozygotes pour les allèles invalidés des gènes *gpx4* et *gpx5*.

Chaque expérimentation est réalisée simultanément sur une ou plusieurs souris sauvages et une ou plusieurs souris invalidées.

3. Génotypage

a. Extraction de l'ADN génomique

Lors de l'identification des animaux par un numéro, les doigts des souris sont coupés selon un code spécifique au laboratoire. L'ADN génomique des souris est extrait de ces doigts.

Les doigts sont incubés pendant une nuit à 55°C dans du tampon de lyse (Tris 100 mM pH 8,5, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, SDS 0,2 %, Protéinase K 0,08 mg/mL). Après une centrifugation de 10 minutes à 10 000g, un volume de surnageant est prélevé puis additionné de 2 volumes d'éthanol absolu. Une agitation par inversion permet de former un précipité d'ADN qui est culoté par une centrifugation de 10 minutes à 10 000g. Le surnageant est éliminé et l'ADN est séché à l'air libre. Il est ensuite solubilisé dans 100 µL d'eau bidistillée stérile exempte de nucléases, par une incubation d'une nuit à 4°C puis de 15 minutes à 55°C. Il peut alors être stocké à -20°C.

Gène cible	N° GenBank	Séquence des amorces de 5' en 3'	Taille (pb)	T _a
<i>gpx4</i>	NC_000076.5	P1/ F – TCGGCGGCGCCTTGGCTACCGGCTC		60°C
		P2/ R – GGATCCGCCGCGCTGTCTGCAGCGTCCC	119	
		P3/ R – TGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGG	342	
<i>gpx5</i>	NC_000079.5	P4/ F – GTGTCTGAGAATCTAGTCCTAGC		60°C
		P5/ R – GTGACAGTTTCTCAGGGGTTGG	263	
		P6/ R – CTGCCTTGTGAAGGTTGACAGG	1498/278	

Tableau 6 : Les amorces utilisées pour le géotypage

pb : paires de bases ; T_a : température d'hybridation.

b. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Pour établir la présence homo- ou hétérozygote de l'allèle sauvage ou muté pour chacun des deux gènes chez chaque souris, des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) indépendantes sont réalisées suivant le même protocole. L'ADN génomique (1 µL) est additionné de 2,5 mM de MgCl₂, de 400 mM de dNTPs, de 400 nM de chacune des 2 amorces (*forward*/F et *reverse*/R ; tableau 6 ; figure 62) et de 1,25 U de GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, USA) pour un volume final de 25 µL. Les réactions de polymérisation sont effectuées indépendamment dans un thermocycleur (Mastercycler personal, Eppendorf, Le Pecq, France).

L'analyse de la taille des produits de PCR est effectuée par l'électrophorèse de 10 µL d'échantillon sur gel d'agarose à 2 %, en présence de bromure d'éthidium (BET). Les résultats sont révélés sur un banc UV.

4. Manipulations

a. Test de fertilité

Le test de la fertilité des souris mâles est réalisé avec 6 mâles de chaque génotype, sauvage et DKO, et 2 femelles sauvages de même souche âgées de 3 mois pour chaque mâle. Le cycle sexuel des souris femelles est synchronisé. À cette fin, le mâle dont la fertilité doit être testée est laissé seul dans la cage pendant 72 heures puis retiré. Les 2 femelles attribuées au mâle sont placées seules dans la cage à sa place, où elles restent pendant 48 heures. Le mâle est ensuite ajouté avec les 2 femelles pour une durée de 7 jours. Par la suite, les 2 femelles sont placées dans des cages individuelles jusqu'à la fin du test.

Le délai de conception, le nombre de petits par portée et la mortalité périnatale sont mesurés. Le délai de conception correspond au nombre de jours entre la mise en présence des souris mâle et femelles et la naissance des souriceaux. Les mêmes mâles sont testés à différents âges.

b. Prélèvements

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale.

➤ Tissus

Les tissus prélevés lors de la dissection (épididyme, testicule, foie...) sont immédiatement traités. Les tissus nécessaires à une future extraction de l'ARN ou des protéines sont placés dans des tubes stériles, congelés dans l'azote liquide, puis transférés à -80°C. Les tissus destinés à une inclusion en paraffine en vue d'une analyse histologique sont incubés dans du Carnoy (éthanol absolu 60 %, chloroforme 30 %, acide acétique 10 %) à température ambiante pendant 1 heure.

➤ Spermatozoïdes

Les têtes et/ou les queues d'épididyme sont prélevés puis placées dans du milieu M2 (tableau 7 ; # M7167, *embryo tested*, Sigma-Aldrich) à température ambiante pour permettre la survie des spermatozoïdes. Les tissus sont dilacérés afin de libérer les gamètes dans le milieu M2, dans

Composants	Concentration (g/L)
Chlorure de calcium, 2 H ₂ O	0,25137
Sulfate de magnésium anhydre	0,1649
Chlorure de potassium	0,35635
Phosphate de potassium monobasique	0,162
Bicarbonate de sodium	0,35
Chlorure de sodium	5,53193
Albumine, fraction V bovine	4,0
D-Glucose	1,0
HEPES, Na	5,42726
Rouge de phénol, Na	0,0106
Acide pyruvique, Na	0,0363
DL-Acide lactique, Na	2,95

Tableau 7 : La composition du milieu M2 (Sigma-Aldrich)

Processus	Étape	Durée
Déshydratation	Éthanol 95°	1h
	Éthanol 100°	1h30
	Éthanol 100°	2h30
Clarification	Histo-Clear	2h
	Histo-Clear	2h
Imprégnation	Paraffine	1h
	Paraffine	1h30

Tableau 8 : Le programme de paraffinage des tissus

L'Histo-Clear (National diagnostics, USA) est un substituant du xylène. Il s'agit de D-limonène, distillé et purifié à partir d'oranges.

lequel ils diffusent durant 10 minutes à 37°C. La concentration de la suspension de spermatozoïdes est déterminée par comptage sur cellule de Malassez.

Lorsque l'analyse des spermatozoïdes nécessite la réalisation d'un frotti sur lame, la suspension de spermatozoïdes est centrifugée à 300g pendant 5 minutes de façon à éliminer le milieu M2. Une fois le surnageant retiré, le culot de spermatozoïdes est lavé par un volume de PBS 1X, centrifugé à nouveau puis repris dans du PBS 1X. Un frotti de 60 000 spermatozoïdes/lame est réalisé à partir de cette suspension, sur des lames Superfrost® (Menzel-Gläser, Allemagne). Les frottis sont séchés à l'air libre pendant 1 heure minimum avant tout traitement ou coloration. Chaque échantillon est analysé en triplicat, pour chaque paramètre.

II. Analyses tissulaires

1. Préparation des coupes de tissu

À la fin de la fixation des tissus, ces derniers sont lavés 3 fois dans de l'éthanol 70° et placés dans des cassettes ajourées. La déshydratation et le paraffinage des tissus sont ensuite réalisés dans un automate, le Microm STP 120 Spin Tissue Processor (Thermo Scientific), réalisant le programme décrit dans le tableau 8. Lorsque le programme est terminé, les tissus imprégnés de paraffine sont inclus en bloc de paraffine. Des coupes de tissu de 5 µm sont ensuite réalisées avec un microtome (Microm HM 340 E) et placées sur des lames traitées (Polylysine®, Menzel-Gläser, Allemagne).

2. Coloration

Au moment de l'utilisation des lames, les tissus sont déparaffinés. Pour cela, les lames sont incubées à 55°C pendant quelques minutes (testicule) ou quelques heures (épididyme) pour faciliter le retrait de la paraffine. Le déparaffinage et la coloration sont réalisés par l'automate Microm Linear Slide Stainer HMS 70 (Thermo Scientific) suivant le programme décrit dans le tableau 9 pour le trichrome de Masson-Goldner et dans le tableau 10 pour l'hématoxyline-éosine.

À la fin du protocole de coloration, les tissus sont déshydratés, conservés dans l'Histo-Clear (D-limonène pure se substituant au xylène ; National diagnostics, USA) et prêts à être montés sous lamelle avec du Cytoseal 60™ (Richard-Allan Scientific, Thermo Scientific) comme milieu de montage.

Dans la coloration au trichrome de Masson-Goldner, l'hématoxyline de Mayer (Microm, Thermo Fisher scientific, Allemagne) colore les noyaux des cellules en bleu, tandis que la fuchsine et le ponceau (fuchsine 0,033 %, ponceau 0,066 % dans de l'acide acétique à 0,2 %) colorent les structures cytoplasmiques acidophiles en rose-rouge. L'orange G molybdique (à 0,1 % dans de l'acide phosphomolybdique à 1 %) permet de modifier la nuance rouge des composés les plus acidophiles et le vert lumière (0,1 % dans de l'acide acétique à 2 %) colore les fibres de collagène en vert afin de visualiser le tissu conjonctif. Lors de la coloration en hématoxyline-éosine, l'éosine

Étape	Réactif	Temps
1	Histo-Clear	15'
2	Histo-Clear	15'
3	Éthanol 100°	1'
4	Éthanol 95°	1'
5	Éthanol 70°	1'
6	Eau courante	1'
7	Hématoxyline de Mayer	3'
8	Eau courante	5'
9	Fuchsine-Ponceau	5'
10	Acide acétique à 1 %	1'
11	Orange G molybdique	00' 20"
12	Acide acétique à 1 %	1'
13	Vert lumière	10'
14	Acide acétique à 1 %	1'
15	Éthanol 70°	00' 30"
16	Éthanol 95°	00' 30"
17	Éthanol 100°	5'
18	Butanol	5'
19	Histo-Clear	5'

Tableau 9 : Le programme de coloration au trichrome de Masson-Goldner

Étape	Réactif	Temps
1	Histo-Clear	15'
2	Histo-Clear	15'
3	Éthanol 100°	1'
4	Éthanol 95°	1'
5	Éthanol 70°	1'
6	Eau courante	1'
7	Hématoxyline de Mayer	4'
8	Eau courante	4'
9	Éosine	30"
10	Eau courante	2'
11	Éthanol 70°	30"
12	Éthanol 95°	30"
13	Éthanol 100°	5'
14	Butanol	5'
15	Histo-Clear	5'

Tableau 10 : Le programme de coloration à l'hématoxyline et à l'éosine

(Éosine 225 à 1 %, Ral diagnostics) colore les molécules basiques du cytoplasme des cellules en rose. Les tissus colorés sont observés avec le microscope Axioplan2 (Carl Zeiss, Allemagne) en lumière transmise.

III. Analyses spermatiques

1. Coloration de Shorr

L'analyse de la morphologie générale des spermatozoïdes est réalisée par observation et comptage des spermatozoïdes sur un frotti. Afin de faciliter l'observation, les frottis de spermatozoïdes subissent une coloration de Shorr. Les lames sont colorées manuellement en suivant le protocole décrit dans le tableau 11. Les lames sont ensuite directement montées de façon permanente avec une lamelle et du Cytoseal 60™ (Richard-Allan Scientific, Thermo Scientific). Les spermatozoïdes sont observés et comptés avec le microscope Axioskop (Carl Zeiss, Allemagne) en lumière transmise, sur un total de 300 spermatozoïdes par frotti.

2. Coloration au bleu de toluidine

Le niveau de la condensation de la chromatine spermatique est évalué par l'utilisation d'un colorant, le bleu de toluidine ou chlorhydrate de triméthylthionine, est un colorant basique qui possède une forte affinité pour les molécules basophiles dont les acides nucléiques, qui seront alors colorés en différentes nuances de bleu dans les cellules animales, voire en d'autres couleurs dans les cellules végétales. Ainsi, dans le spermatozoïde, le bleu de toluidine colore le noyau en bleu de façon plus ou moins intense selon le degré d'ouverture de la chromatine (figure 40) : un ADN fortement condensé ne laissera pénétrer que peu de colorant, donnant un bleu très pâle au noyau, tandis qu'un ADN peu condensé acceptera plus de colorant, apportant un bleu très foncé au noyau.

Cette coloration est réalisée à partir de frottis de spermatozoïdes séchés. Les lames sont tout d'abord fixées pendant 30 minutes à 4°C dans un mélange volume à volume d'éthanol 95° et d'acétone, puis incubées à 4°C dans de l'HCl 0,1 N pendant 5 minutes. Après un lavage rapide dans l'eau distillée, les lames sont incubées pendant 17 minutes à température ambiante dans une solution filtrée de bleu de toluidine à 1 % en tampon de McIlvain (200 mM Na₂HPO₄, 100 mM acide citrique, pH 3,5). Les lames sont ensuite déshydratées par des bains successifs de 2 minutes d'éthanol de degré croissant (70°, 95° puis 100°) pour pouvoir être montée de façon permanente avec du Cytoseal 60™ (Richard-Allan Scientific, Thermo Scientific).

Les spermatozoïdes sont observés et comptés avec le microscope Axioskop (Carl Zeiss, Allemagne) en lumière transmise et en contraste de phase, sur un total de 300 spermatozoïdes par dépôt.

Étape	Temps
Éthanol 70°	1'
Eau courante	2'
Héματοxyline de Mayer	3'
Eau courante	3'
Alcool ammoniacal	passage
Eau courante	3'
Éthanol 70°	passage
Éthanol 95°	passage
Colorant de Shorr	1'
Éthanol 95°	passage
Éthanol absolu	passage
Éthanol absolu	passage
Histo-Clear	passage

Tableau 11 : La coloration de Shorr

Alcool ammoniacal : 95 % d'alcool à 70° / 5 % d'ammoniaque à 25 %.

3. Cytométrie en flux

Le laser du cytomètre produit une lumière monochromatique qui excite spécifiquement un fluorochrome à une longueur d'onde donnée. De nombreux fluorochromes peuvent être excités à cette longueur d'onde, permettant l'étude de plusieurs paramètres cellulaires et spermatiques. Pour cette analyse les spermatozoïdes de la tête d'épididyme sont dilués pour obtenir une concentration finale de 5 10⁴ cellules/mL, ceux de la queue de l'épididyme à 10⁵ cellules/mL pour un volume final de 500 µL.

Pour analyser les cellules spermatiques, 2 fluorochromes sont ajoutés à des concentrations différentes avant le passage au cytomètre. Le premier est la chromomycine A3 (CMA3, Sigma) qui est incubée 20 minutes à température ambiante avec les spermatozoïdes à une concentration finale de 0,25 mg/mL. Il s'agit d'un intercalant de l'ADN spécifique des séquences d'ADN riches en guanine et cytosine, qui permet d'estimer la condensation de l'ADN, car il s'intercale dans l'ADN seulement lorsqu'il est décondensé. Il émet une fluorescence en FL2 (de 560 nm à 590 nm). Plus l'intensité de la fluorescence FL2 est importante, moins l'ADN est condensé. Le deuxième fluorochrome utilisé dans le cadre de cette étude est le monobromobimane (mBrB Thiolyte, Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France) qui se lie spécifiquement aux groupements thiols libres (SH). Il est ajouté aux spermatozoïdes à 0,5 mM et laissé 10 minutes à température ambiante avant d'être analysé au cytomètre. L'intensité de fluorescence émise en FL1 (de 515 nm à 545 nm) est proportionnelle à la quantité de SH libre. Pour chaque échantillon, 10 000 événements sont comptés. Après passage au cytomètre en flux, les données sont analysées à l'aide du logiciel BD CellQuest Pro logiciel (Becton Dickinson).

4. Microscopie électronique

La suspension de spermatozoïdes en milieu M2 est centrifugée à 300g pendant 5 minutes de façon à retirer le milieu. Le culot de spermatozoïdes est lavé en PBS 1X, puis dans du tampon cacodylate de sodium ((CH₃)₂AsO₂Na 0,1 M, pH 7,2, sucre 3 mM, CaCl₂ 0,1 M). Les spermatozoïdes sont ensuite fixés dans du glutaraldéhyde à 2 % et de paraformaldéhyde à 0,5 % en tampon cacodylate de sodium, pendant 2 heures, à 4°C. Les cellules sont centrifugées à 400g pendant 5 minutes pour éliminer le tampon de fixation, puis lavées pendant 10 minutes dans du tampon cacodylate de sodium. Elles sont ensuite incubées pendant 45 minutes à température ambiante dans du tampon cacodylate additionné de tétroxyde d'osmium à 1 %, qui est un fixateur des membranes lipidiques. Les spermatozoïdes sont lavés pendant 10 minutes dans du tampon cacodylate de sodium, puis déshydratés. À partir de l'étape de déshydratation des cellules, le protocole varie selon que l'analyse des spermatozoïdes est effectuée en microscopie électronique à balayage (MEB) ou à transmission (MET).

Pour la MEB, la déshydratation consiste en un bain d'éthanol 70° d'une nuit, un bain d'éthanol 95° de 10 minutes, 2 bains d'éthanol absolu de 10 minutes chacun, 2 bains de 10 minutes dans un mélange d'éthanol 100° et de hexaméthylsilazane (HMDS) (1:1) et 2 bains de 10 minutes dans de l'HMDS pur. Les spermatozoïdes sont ensuite déposés sur une lamelle de verre. Pour cela, une lamelle est déposée au fond d'un puits d'une plaque 24 puits, puis est recouverte de la

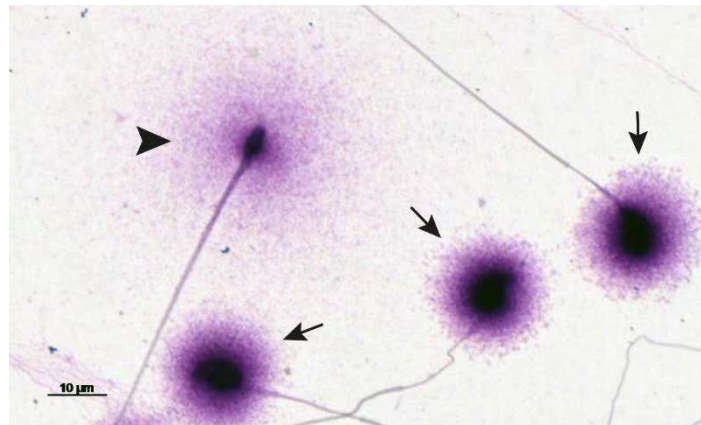


Figure 64 : La fragmentation de l'ADN spermatique

La fragmentation de l'ADN spermatique est analysée à l'aide du kit Halomax. Après traitement et coloration, les spermatozoïdes dont l'ADN n'est pas fragmenté présentent un halo intense et compact (flèche, →), tandis que ceux dont l'ADN est fragmentés possèdent un halo clair et étendu (tête de flèche, ►). Échelle : 10 µm.

suspension de spermatozoïdes en HDMS. L'HDMS s'évapore pendant 3 heures, laissant les spermatozoïdes déshydratés sur la lamelle. Les spermatozoïdes subissent ensuite une étape de métallisation avec un mélange d'or et de palladium dans un métalliseur JFC-1300 (JEOL, Croissy-sur-seine, France). Les spermatozoïdes sont observés avec le microscope électronique à balayage JSM-6060 Low Vacuum (JEOL, Croissy-sur-seine, France).

Pour la MET, la déshydratation consiste en un bain d'éthanol 70° d'une nuit à 4°C, un bain d'éthanol 70° d'une journée à 4°C, un bain d'éthanol 95° de 20 minutes, un bain d'éthanol absolu de 40 minutes, 3 bains de 20 minutes dans de l'acétone 100°. Les spermatozoïdes sont inclus en résine époxyde avec le kit Embed-812 (Electron Microscopy Science). Pour cela, les cellules sont imprégnées progressivement dans une concentration croissante de résine diluée dans l'acétone (acétone/résine 2:1 pendant 2 heures ; 1:1 pendant 30 minutes ; 1:2 pendant 45 minutes), puis incluse dans de la résine pure, durcie pendant 2 jours à 60°C. Des coupes de 70 nm d'épaisseur sont réalisées dans les blocs de résine avec un ultramicrotome EM UC6 (Leica, Allemagne), puis colorées avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb. Les coupes sont stabilisées par une fine couche de carbone dans un évaporateur E6500 MHVE (Quorum Technologies, Royaume-Uni). Les spermatozoïdes sont observés avec le microscope électronique à transmission H-7650 (Hitachi, Elexience, France).

5. Analyses de la fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN spermatique est évaluée à l'aide d'un kit appelé Halomax[®] (Halotech DNA SL, Madrid, Espagne), basé sur le test de dispersion de la chromatine spermatique (*sperm chromatin dispersion*, SCD). Il consiste à dénaturer la chromatine par un traitement acide qui va provoquer la dispersion de l'ADN des cellules prisonnières d'un gel d'agarose. L'ADN fragmenté (cassures simple et double brin) ne présente pas le même schéma de dispersion que l'ADN non fragmenté. Ainsi, une coloration de l'ADN permettra une observation de cette dispersion et un comptage des spermatozoïdes dont l'ADN est fragmenté.

Pour réaliser ce test, 0,2.10⁶ spermatozoïdes en suspension dans le milieu M2 sont ajoutés à un tube fourni d'agarose à 1 % à bas point de fusion fondu (chauffé dans un bain-marie à 90°C, puis refroidi 5 minutes à 37°C), puis mélangés. Pour chaque échantillon à tester, 2 tubes sont réalisés. Le mélange est immédiatement déposé en duplicat (soit 4 dépôts/échantillon) sur une lame couverte d'une fine couche d'agarose 0,65 % à haut point de fusion, couvert d'une lamelle pour étaler uniformément la préparation en une fine couche, maintenu 5 minutes à 4°C pour permettre la solidification de l'agarose entourant les spermatozoïdes, puis les lamelles sont ôtées.

Les spermatozoïdes inclus dans l'agarose subissent ensuite un traitement qui va les lyser et dénaturer leur ADN. Pour cela, les lames sont incubées pendant 5 minutes à température ambiante dans le tampon de lyse fourni et additionné de 0,7 % de β -mercaptoéthanol. Les lames sont rincées dans un bain d'eau ultrapure pendant 5 minutes puis déshydratées par des bains successifs d'éthanol de degré croissant (70°, 90° puis 100°) de 2 minutes. Pour finir, les lames sont colorées pendant 7 minutes dans du colorant de Wright (mélange 1:1 d'une solution d'éosine/bleu de méthylène selon Wright [Merck Chemicals] et d'un tampon phosphate pH 6,88 [Merck Chemicals]). Les lames

Antigène	Type	Fournisseur	Référence	Dilution	Hôte
8-OHdG	Monoclonal (15A3)	Novus biologicals	NB110-96878	IC/IF : 1/500 Bl : 1/1000	Souris
Protamine1	Monoclonal (Hup 1N)	Briar Patch Biosciences	Hup-1N-150	IC/IF : 1/50 Bl : 1/1000	Souris
Histone 3	Polyclonal	Abcam	ab1791	IC/IF : 1/200 Bl : 1/1000	Lapin
TH2B	Polyclonal	Abcam	ab23913	IC/IF : 1/100 Bl : 1/700	Lapin
TOPO II β	Polyclonal	Santa cruz biotechnology	sc-13059	IC/IF : 1/10 Bl : 1/250	Lapin
IgG de souris (HRP)	Polyclonal	P.A.R.I.S anticorps	BI 2413C	IC/IF : 1/500 Bl : 1/2000	Chèvre
IgG de lapin (HRP)	Polyclonal	P.A.R.I.S anticorps	BI 2407	Bl : 1/2000	Chèvre
IgG de souris (Alexa)	Polyclonal	Molecular Probes, Invitrogen	A488 : A11017 A555 : A21425	IC/IF : 1/1000	Chèvre
IgG de lapin (Alexa)	Polyclonal	Molecular Probes, Invitrogen	A488 : A11070 A555 : A21430	IC/IF : 1/1000	Chèvre

Tableau 12 : Les anticorps utilisés en immunocytochimie, immunofluorescence et dot blot

Bl : dot/slot blot ; HRP: *horseradish peroxidase* ; IC : immunocytochimie ; IF : immunofluorescence.

sont ensuite rincées rapidement avec de l'eau distillée, séchées à l'air libre, puis montées de façon permanente avec du Cytoseal 60™ (Richard-Allan Scientific, Thermo Scientific).

L'observation et le comptage des spermatozoïdes sont réalisés sur le microscope Axioskop (Carl Zeiss, Allemagne) en lumière transmise, sur un total de 500 spermatozoïdes par dépôt. Les spermatozoïdes de souris présentent tous un halo, mais celui-ci est petit et compact si l'ADN n'est pas fragmenté et large et clair si l'ADN est fragmenté (figure 64).

6. Immunocytochimie et immunocytofluorescence

La présence et la localisation nucléaire d'ADN oxydé ou d'une protéine dans les spermatozoïdes est déterminée par une immunocytochimie dans des conditions perméabilisantes sur des spermatozoïdes dont l'ADN a préalablement été décondensé, afin de permettre aux anticorps d'atteindre leur antigène au cœur du noyau.

Les spermatozoïdes en suspension dans du milieu M2 sont centrifugés pendant 5 minutes à 300g pour éliminer le M2. Le culot de spermatozoïdes est repris dans le tampon de décondensation (PBS 1X, Triton X-100 0,5 %, dithiothréitol [DTT] 2 mM) dans lequel il est incubé pendant 1 heure à température ambiante. Cette suspension est ensuite centrifugée à 300g pendant 5 minutes pour éliminer ce tampon de décondensation. Les spermatozoïdes sont lavés 1 fois dans du PBS 1X, avant d'être à nouveau suspendus en PBS 1X, étalés sur lame à raison de 60 000 spermatozoïdes/lame, puis séchés à l'air libre pendant au moins 1h30. Dans le cas où un traitement à l' H_2O_2 serait nécessaire pour mimer un stress oxydant des gamètes lors de leur transit épидидymaire, après le lavage du tampon de décondensation, la suspension est incubée pendant 2 heures dans du PBS 1X avec 0,024 % de H_2O_2 (soit 7 mM). Cette suspension est ensuite lavée dans du PBS 1X avant de pouvoir réaliser le frotti sur lame.

Les lames comportant les frottis de spermatozoïdes séchés sont incubées pendant 30 minutes à 4°C dans du fixateur (mélange 1:1 d'éthanol 95° et d'acétone). Les spermatozoïdes sont ensuite réhydratés par des bains successifs de 2 minutes dans de l'éthanol de degré décroissant (95°, 90° et 70°) puis dans un bain d'eau distillée. Dans le cas d'une révélation du marquage utilisant la horseradish peroxydase (HRP ; cytochimie avec le kit NovaRED™), les peroxydases endogènes sont inhibées par une incubation de 30 minutes à température ambiante dans de l' H_2O_2 à 0,3 %. Les lames sont ensuite lavées dans du PBS 1X, Triton X-100 0,1 % pendant 5 minutes, puis saturées pendant 30 minutes à température ambiante dans du tampon de saturation (PBS 1X, Triton X-100 0,1 %, sérum de chèvre [NGS] 1,5 %). Les lames sont alors incubées avec l'anticorps primaire (tableau 12) dilué dans le tampon de saturation pendant une nuit à 4°C. Les lames sont lavées 2 fois dans du PBS 1X, Triton X-100,1 %, puis incubées avec l'anticorps secondaire (tableau 12) dilué dans le tampon de saturation pendant 1 heure à température ambiante. Elles subissent alors 2 lavages de 5 minutes dans du PBS 1X.

Par la suite, les lames révélées par cytochimie (marquage anti-8-OHdG pour comptage) sont incubées 15 minutes dans la solution de révélation du kit NovaRED™ Substrate for peroxidase (Vector Laboratories), rincées 5 minutes dans de l'eau distillée, déshydratées

(éthanol 70°, 95°, 100°, puis Histo-Clear), puis montées avec du Cytoseal 60™ (Richard-Allan Scientific, Thermo Scientific).

Les lames révélées par fluorescence sont incubées 5 minutes dans du PBS 1X, Hoechst 33342 1 µg/mL (marquage de l'ADN), lavées 3 fois pendant 5 minutes en PBS 1X, montées avec du PBS 1X/glycérol (1:1), puis conservées à 4°C.

Lors de la réalisation d'un double marquage en fluorescence, le marquage d'un premier antigène est réalisé comme décrit précédemment, excepté que le tampon de saturation ne contient pas du NGS mais de l'albumine sérique bovine (BSA) à 0,1 %. Après les lavages de l'anticorps secondaire du premier marquage, les lames sont à nouveau incubées dans le tampon de saturation pendant 30 minutes à température ambiante, puis elles sont incubées en présence de l'anticorps primaire dirigé contre le second antigène, dilué dans le tampon de saturation pendant une nuit à 4°C. Les lames sont lavées 2 fois dans le PBS 1X, Triton X-100 0,1 %, avant d'être incubées pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire dirigé contre le second anticorps primaire. Les lames sont lavées dans le PBS 1X, puis marquées avec du Hoechst 33342 et montées en PBS 1X/glycérol, comme indiqué précédemment.

L'observation et le comptage des spermatozoïdes immunomarqués pour le 8-OHdG et révélés par cytochimie sont réalisés avec le microscope Axioplan2 (Carl Zeiss, Allemagne) en lumière transmise. L'observation des marquages fluorescents est effectuée par microscopie confocale avec le microscope LSM 510 META Confocal Imaging System (Carl Zeiss, Allemagne).

7. Analyse de l'acrosome et du noyau

Pour pouvoir visualiser les différents compartiments de la tête des spermatozoïdes, il est possible de réaliser un marquage simultané de l'acrosome et du noyau. Le noyau est marqué par le Hoechst 33342, tandis que l'acrosome est marqué par une lectine de l'arachide (*peanut agglutinin*, PNA), couplée à un fluorochrome, capable de se fixer spécifiquement à certains sucres localisés sur la membrane externe de l'acrosome. Ainsi, si un spermatozoïde a réalisé la réaction acrosomique, la membrane externe de l'acrosome est perdue et le marquage est absent.

Des lames comportant un frotti de spermatozoïdes séché sont réhydratées par une incubation de 5 minutes en PBS 1X. Elles sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 37°C avec 50 µg/mL de PNA couplé à un fluorochrome Alexa488. Après 2 lavages de 5 minutes à température ambiante en PBS 1X, les lames sont incubées pendant 5 minutes dans du PBS 1X, Hoechst 33342 1 µg/mL, lavées 3 fois pendant 5 minutes en PBS 1X, montées avec du PBS 1X/glycérol (1:1), puis conservées à 4°C.

L'observation des lames est réalisée avec un microscope à épifluorescence Axioplan 2 (Carl Zeiss, Allemagne).

IV. Dosage du malondialdéhyde

La peroxydation lipidique dans le tissu épидидymaire et les spermatozoïdes est évaluée par la mesure de la concentration en produits de la peroxydation lipidique, tels que le malondialdéhyde (MDA), qui réagissent avec l'acide thiobarbiturique pour former un composé fluorescent.

Les échantillons à analyser sont incubés avec 10 % d'acide trichloracétique, 0,67 % d'acide thiobarbiturique et 1 mM de hydroxytoluène butylé (BHT, prévient une peroxydation lipidique supplémentaire dues aux conditions expérimentales). Le mélange est chauffé pendant 30 minutes dans un bain-marie bouillant. Un volume de n-butanol est ajouté au volume de l'échantillon. Après centrifugation de ce mélange, la phase organique est prélevée pour effectuer des mesures de la fluorescence à 532 nm. Les résultats sont exprimés en mmol de MDA par gramme de protéines.

V. Analyses transcriptionnelles

1. Extraction de l'ARN

L'extraction des ARN totaux est effectuée avec le kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Allemagne).

Les tissus congelés dont l'expression des gènes doit être analysée sont broyés à l'aide d'un piston dans 300 μ L de tampon RA1 du kit d'extraction additionné de 1 % de β -mercaptoéthanol. Le broyat est ensuite soumis au protocole indiqué par le fournisseur du kit, consistant à le filtrer puis le passer sur une colonne de silice où se fixent les acides nucléiques, dont l'ADN qui sera digéré par l'emploi de DNase. Après lavage de la colonne, l'ARN est élué dans l'eau pure sans RNases du kit. L'ARN est ensuite dosé au Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) et sa qualité est évaluée grâce au rapport DO^{260}/DO^{280} . L'ARN purifié est conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

2. Reverse transcription

La réverse transcription est réalisée sur 2 μ g d'ARN total avec le kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, USA) en utilisant les amorces hexamériques aléatoires fournies. Pour chaque échantillon, un mélange de 2 μ g d'ARN purifié, 0,5 μ g d'amorces et d'eau distillée ultrapure d'un volume final de 10 μ L est incubé à 70°C pendant 10 minutes, avant d'être brutalement refroidi dans la glace pendant 5 minutes. Puis, 2 mM de dNTP, 1 U/ μ L de RNasin®, 1 U/ μ L de M-MLV reverse transcriptase et du tampon GoScript™ 1X sont ajoutés pour un volume final de 20 μ L avant de réaliser la réaction de transcription reverse dans un thermocycleur (Mastercycler personal, Eppendorf, Le Pecq, France) : 10 minutes à 25°C , une heure à 42°C , 15 minutes à 70°C . Les ADNc produits sont conservés à -80°C .

Gène ciblé	N° GenBank	Séquence des amorces de 5' en 3'	Taille (pb)	T _a (°C)
<i>cyclophilin B</i>	NM_011149.2	F – GGAGATGGCACAGGAGGAA R – GCCCGTAGTGCTTCAGCTT	76	57 à 62
<i>gpx1</i>	NM_008160.5	F – GTCCACCGTGATGCCTTCT R – CTCCTGGTGTCCGAAGTAT	217	62
<i>gpx3</i>	NM_008161.2	F – TCGGAGATACTCCCCAGTC R – AGTTCCAGCGGATGTCATGG	211	58
<i>gpx4</i>	NM_008162.2	F – AGTACAGGGGTTTCGTGTGC R – CGGCAGGTCCTTCTCTATCA	410	62
<i>catalase</i>	NM_009804.2	F – GCAGATACCTGTGAAGTGTG R – GTAGAATGTCCGCACCTGAG	229	62
<i>sod3</i>	NM_011435.3	F – GCTCTCAGAGAACCCCTCT R – GTGCTATGGGGACAGGAAGA	170	58
<i>prdx1</i>	NM_011034.4	F – CAACTGCCAAGTGATTGGCG R – TGAGCAATGGTGCCTTGGG	135	59
<i>prdx2</i>	NM_011563.5	F – TGACTTCACGGCCACAGCGG R – CGGAAGTCCTCAGCATGGTC	159	61
<i>prdx3</i>	NM_007452.2	F – CAGACATACTGTGGTCTGCC R – AAGTCGTCGAGACTCAGCTC	151	59
<i>prdx4</i>	NM_016764.4	F – CAGGACATACTCTTAGAGGCC R – TCACTACCAGGTTTCCAGCC	178	62
<i>prdx5</i>	NM_012021.2	F – CGTGCATCGACGTGCTTGGC R – ACCTCCACTGAGGGAATGGC	137	60
<i>prdx6</i>	NM_007453.3	F – CACAGAAGTTGGCAGAGCTG R – TCGACTGGATCCAACATGCC	219	59
<i>txn1</i>	NM_011660.3	F – TGGTGAAGCTGATCGAGAGC R – GGAATACTTGTCACAGAGGG	149	59
<i>txn2</i>	NM_019913.5	F – GGTGGTCATGGCCAAAGTGG R – CTCTAGCTGGTCCCTCGTCC	146	61
<i>txn1l</i>	NM_016792.4	F – ACTGTGGCATTCAATCAGCC R – AGTTGGCTCACTCCTTCCG	144	57
<i>gst μ</i>	NM_010358.5 NM_008183.3	F – GAAGTTCAAGCTGGGCCTGG R – GCATGATGAGCTGCATGCGG	194	59
<i>gst π</i>	NM_013541.1 NM_181796.2	F – AGCTTTCATCGTGGGTGACC R – GGGACGGTTCACATGTTCCG	187	59
<i>txndc2</i> (<i>sptrx1</i>)	NM_001146002.1	F – GGAGCTCCTGAAGAGTCGG R – GGCTTCTCTTTGGACTGGG	150	62
<i>txndc3</i> (<i>sptrx2</i>)	NM_181591.3	F – CCCTGAAGAGGTAGTGAGGG R – GGTGCAAACCTAACGTGAGGC	207	59
<i>txndc8</i> (<i>sptrx3</i>)	NM_026132.2	F – GTTTGCTCAGGTGGATGTGG R – CTTCGGTCCACTTCTGAGGC	154	62
<i>pdia3</i> (<i>erp57</i>)	NM_007952.2	F – GGACATTGCAAGAGGCTTGCCC R – TAGGCCCATCATAAGCACCCGC	184	62
<i>pdia4</i> (<i>erp72</i>)	NM_009787.2	F – TGATGGCTCCAGGACCCAGG R – TTGCTGAGCTCCTTGGCAGC	222	61
<i>pdia5</i>	NM_028295.1	F – TTTCCAGAAGGCTGCCACCC R – CTCCACGATGTCCTCGGCC	190	62
<i>pdia6</i> (<i>txndc7</i>)	NM_027959.3	F – TGGAAGAAAGCAGCAACGGC R – CATCTACAATGGCTTCTCCC	184	57
<i>pdia10</i> (<i>txndc4/erp44</i>)	NM_029572.2	F – CAGATTGCCCTGTCATAGCC R – TGTCAGTCGGGTCAGGTCCG	159	57
<i>pdia11</i> (<i>txndc1</i>)	NM_028339.1	F – GCTTGTCAGAATCTTCAGCC R – CACATAGCGCCTAAATTCACC	174	60

Tableau 13 : Les amorces utilisées en Q-PCR

pb : paire de bases ; T_a : température d'hybridation.

3. Préparation d'une gamme d'étalonnage

La quantification du taux d'un transcrit présent dans un échantillon donné par PCR quantitative (Q-PCR) se fait en utilisant l'efficacité des amorces sur une gamme étalon d'un plasmide pGEM®-T Easy (Promega, USA) contenant le fragment amplifié. Une gamme de dilution en cascade allant de 0,5 ng/μL à 0,5.10⁻⁶ ng/μL est réalisée pour chaque plasmide.

4. PCR quantitative

Les ADNc de tête d'épididyme et de queue d'épididyme de 5 individus sauvages et 5 individus DKO, ainsi que la gamme du gène analysé, sont déposées en double sur une plaque de 96 puits, à raison de 2 μL par puits. Sur une même plaque sont analysés en parallèle le gène cible et le gène de référence qui est la cyclophiline B. Un mélange contenant 12,5 μL de MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay (Eurogentec, France), 0,3 pmol de chaque amorce du gène analysé et 10 μL d'eau distillée est ajouté dans chaque puits. La Q-PCR est réalisée dans un thermocycleur Mastercycler® ep *realplex* 2 (Eppendorf) selon les températures d'hybridation spécifiques de chaque couple d'amorces (tableau 13). La courbe de fusion de chaque couple d'amorce est réalisée de façon à vérifier la spécificité des amorces et l'efficacité (E) de chaque couple d'amorces est déterminée grâce à la gamme de dilution du plasmide. L'expression des gènes est calculée de façon relative à celle de la cyclophiline B par la formule suivante, où N est le nombre initial de molécules d'ARNm et Ct est le cycle seuil du gène :

$$R = \frac{N_{\text{gène cible}}}{N_{\text{cyclo B}}} = \frac{(E_{\text{cyclo B}} + 1)^{Ct_{\text{cyclo B}}}}{(E_{\text{gène cible}} + 1)^{Ct_{\text{gène cible}}}}$$

VI. Analyses protéiques

1. Extraction des protéines

Les tissus congelés (tête et queue d'épididyme, foie) sont broyés avec un piston dans du tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, EDTA 0,1 mM) dans des tubes maintenus dans la glace. Le broyat obtenu est centrifugé à 12 000g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant est prélevé, puis centrifugé à nouveau. Le dosage des protéines dans le surnageant obtenu est réalisé par spectrophotométrie par la méthode de Bradford avec le kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) selon une gamme étalon d'albumine bovine. Les extraits sont stockés sous forme d'aliquots de 10 μL à -80°C.

2. Mesure de l'activité glutathion peroxydase

La mesure de l'activité glutathion peroxydase est réalisée sur les extraits de protéine de foie et d'épididyme. Elle consiste à doser par spectrophotométrie la disparition du nicotinamide adénine

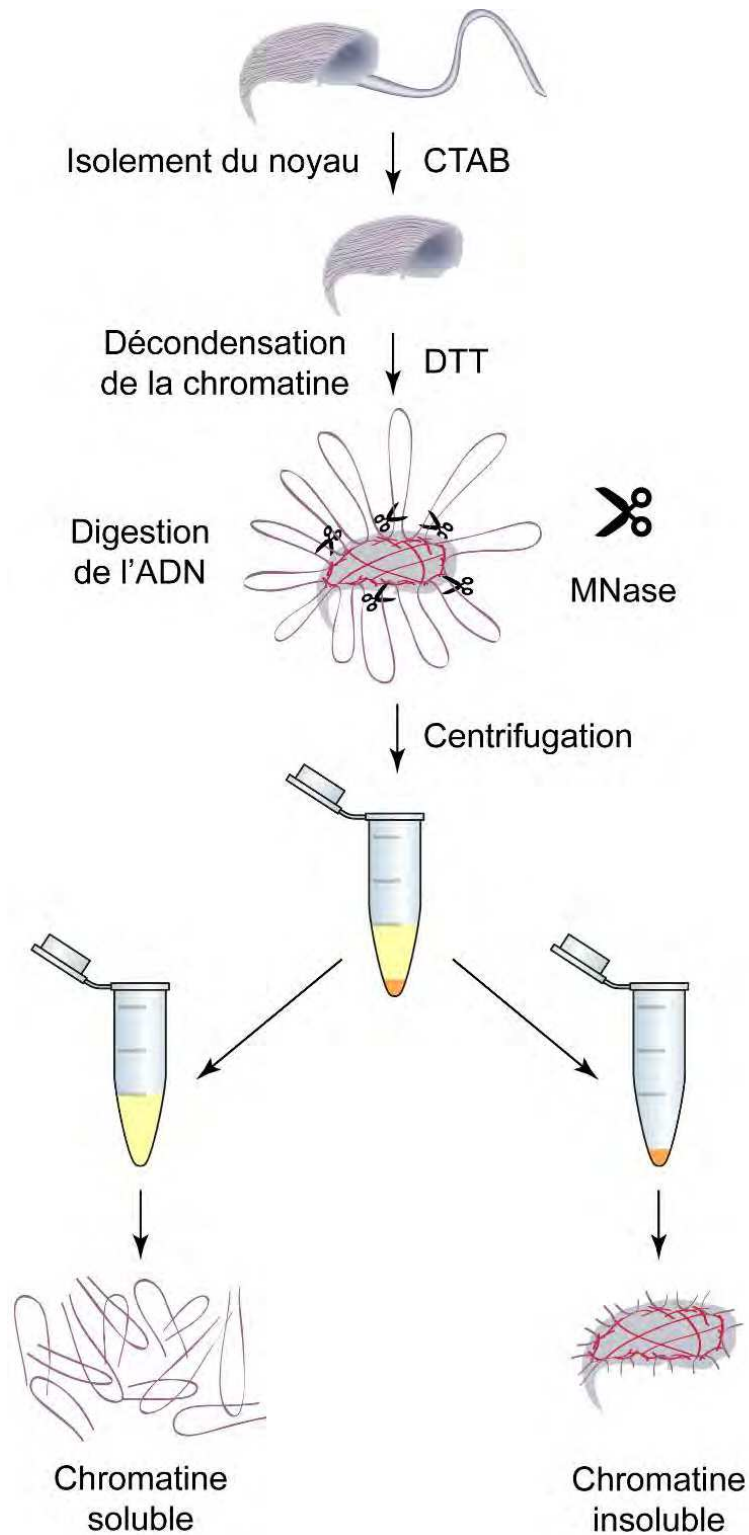


Figure 65 : Le fractionnement de la chromatine spermatique

Le fractionnement de la chromatine spermatique a été réalisé selon les protocoles de Zalenskaya et al. (2000) et Arpanahi et al. (2009). CTAB : bromure de cetyltriméthylammonium ; DTT : dithiothréitol ; MNase : nucléase micrococcale.

dinucléotide phosphate réduit (NADPH), qui est utilisé par l'enzyme glutathion réductase pour la régénération du glutathion (GSH), au fur et à mesure de son oxydation par les GPx. Il s'agit donc d'une mesure indirecte de l'activité globale des GPx. Le substrat utilisé est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est le substrat naturel des GPx.

Le milieu réactionnel est constitué du tampon d'extraction des protéines dans lequel sont ajoutés du NADPH 0,15 mM, du GSH réduit 3 mM et de la GSH réductase 1 U/mL. Pour chaque échantillon testé, la mesure est effectuée avec 0, 5 et 10 μ L de protéine. La mesure est réalisée dans une enceinte dont la température est maintenue à 37°C. Ainsi, lors de chaque mesure, dans une cuve en quartz, le milieu réactionnel est laissé à chauffer 30 secondes, avant que les protéines ne soient ajoutées. Après 10 secondes de chauffage et de diffusion des protéines, 200 μ M du substrat sont ajoutés et mélangés brièvement, puis l'enregistrement de la mesure de densité optique à 340 nm est initié, à raison d'une mesure toutes les 10 secondes, avec le spectrophotomètre UV-160A (Shimadzu). L'activité est ensuite calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire ϵ du NADPH dont la valeur à 340 nm est de 6220 $M^{-1}.cm^{-1}$. L'activité spécifique est ensuite calculée en rapportant la valeur trouvée à la quantité de protéines totales en mg.

VII. Analyses de la chromatine spermatique

1. Fractionnement de la chromatine spermatique

Lorsqu'elle est décondensée par du DTT, la chromatine des spermatozoïdes forme un halo de boucles d'ADN autour du noyau (figure 33). Ces boucles d'ADN qui sortent du noyau semblent principalement associées aux histones persistant après la mise en place des protamines (Zalenskaya *et al.*, 2000 ; Arpanahi *et al.*, 2009). Pour séparer l'ADN lié aux histones de celui lié aux protamines, ils génèrent donc une décondensation de l'ADN spermatique pour former ces halos, puis utilisent une endonucléase pour cliver ces boucles d'ADN hors du noyau qui sont alors solubles dans le tampon. Une simple centrifugation permet alors de séparer la fraction soluble de la fraction insoluble de la chromatine, respectivement liée aux nucléosomes et liée aux protamines (figure 65).

Ce fractionnement de la chromatine spermatique a été réalisé d'après le protocole d'Arpanahi *et al.* (2009), lui-même modifié d'après Zalenskaya *et al.* (2000). Une suspension de spermatozoïdes en milieu M2 est centrifugée à 300g pendant 5 minutes, de façon à retirer le milieu. Les spermatozoïdes sont lavés dans un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8, puis ils sont incubés pendant 30 minutes à 4°C dans du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8, fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) 1 mM, bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) 1 %, en vortexant de temps à autres, de façon à séparer le noyau du flagelle et des membranes. Cette suspension est centrifugée à 3 000g à 4°C pendant 10 minutes pour culoter les noyaux des spermatozoïdes, qui sont ensuite lavés à 2 reprises dans du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8 ; PMSF 1 mM. Les noyaux (10^8) sont incubés pendant 10 minutes à 4°C dans du tampon PBS 1X (sans Mg^{2+} , ni Ca^{2+}), Triton X-100 0,5 %; PMSF 1 mM pour les perméabiliser. Ils sont alors centrifugés pour éliminer le tampon, puis ils sont repris dans le tampon de décondensation (PBS 1X PMSF 5 mM, DTT 10 mM) où ils sont incubés pendant 30 minutes à 37°C. La suspension de noyaux est ensuite additionnée de 3 mM de $CaCl_2$ et de 5 U de nucléase micrococcale (MNase) et incubée

pendant 3 minutes à 37°C. La digestion est immédiatement arrêtée par l'ajout de 20 mM d'acide éthylène glycol tétraacétique (EGTA). La suspension est fortement agitée à 37°C pendant 30 minutes pour libérer les boucles de chromatine clivées, puis elle est centrifugée à 5 000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant, constituant la fraction de chromatine soluble, est conservé à -20°C. Le culot est lavé dans du PBS 1X, PMSF 5 mM puis centrifugé à nouveau. Le culot, constituant la chromatine insoluble, est repris dans du PBS 1X et conservé à -20°C.

Une partie de ces 2 fractions est analysée sans traitement supplémentaire par immunodétection, afin de déterminer la présence ou l'absence des différentes protéines nucléaires basiques. La concentration totale en protéines est déterminée par un dosage de Bradford avec le kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) selon une gamme étalon d'albumine bovine.

L'ADN présent dans le reste de ces fractions est extrait grâce à la méthode du phénol-chloroforme et purifié par précipitation en présence d'éthanol et d'acétate de sodium. L'ADN est ensuite repris dans du tampon TE (Tris 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM) et conservé à -20°C. L'ADN est dosé par utilisation de SYBR gold (Molecular probes, Invitrogen), un intercalant de l'ADN simple et double brin, dans un thermocycleur Mastercycler® ep *realplex* 2 (Eppendorf), selon une gamme étalon réalisée par dilution en cascade d'un échantillon d'ADN génomique de souris de concentration connue (Promega, USA). Les échantillons d'ADN sont alors analysés par un dot blot anti-8-OHdG pour déterminer la localisation des dommages oxydants.

2. Immunoprécipitation de l'ADN spermatique

Pour pouvoir déterminer les séquences d'ADN qui sont endommagées lors d'un stress oxydant, une immunoprécipitation de l'ADN spermatique a été réalisée en utilisant un anticorps dirigé contre la guanine oxydée. Cette immunoprécipitation a été effectuée en parallèle sur les spermatozoïdes de souris sauvages, *gpx5*^{-/-} et *snrpx4;gpx5*^{-/-}, ainsi qu'avec un anticorps anti-5-méthylcytosine, pour contrôler l'efficacité du protocole, et un anticorps aspécifique de même isotype, pour contrôler la spécificité de la précipitation de l'ADN.

a. Extraction, purification et fragmentation de l'ADN spermatique

La suspension de spermatozoïdes est centrifugée à 300g pendant 5 minutes pour éliminer le milieu M2. Le culot de spermatozoïdes est lavé en PBS 1X, puis incubé pendant une nuit à 55°C dans le tampon de lyse (Tris-HCl 25 mM, pH 8 ; SDS 1 % ; EDTA 5 mM ; DTT 0,1 mM ; Protéinase K 0,4 mg/mL). L'ADN du lysat est extrait par la méthode du phénol-chloroforme, puis purifié par une précipitation en présence d'éthanol et d'acétate de sodium. Le précipité d'ADN est solubilisé dans du tampon TE (Tris 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM) et traité pendant 20 minutes à 37°C avec de la RNase A à 20 µg/mL. La concentration et la qualité de l'ADN est mesurée avec le Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Cette concentration est alors ajustée à 100 ng/µL.

Cet ADN spermatique est fragmenté par sonication à puissance maximale par cycles de 15 secondes « ON » & 30 secondes « OFF » à 4°C dans un sonicateur Bioruptor® Standard (Diagenode, Liège, Belgique). Après chaque sonication, la taille des fragments est vérifiée par dépôt de 1 µg d'ADN soniqué sur un gel d'agarose à 1 % en tampon TBE 1X (Tris-HCl 89 mM, pH 8,

DMR ciblée	Méthylation	Séquence des amorces de 5' en 3'	Taille (pb)	T _a (°C)
DMR H19	Paternelle	F – AGGTTGGAACACTTGTGTTTCTGGAG R – TGGGCCACGATATATAGGAGTATGCT	159	61
DMR Rasgrfl	Paternelle	F – CAGAGAGTATGTAAAGCCAGAGC R – CAGCAATAGCGGTAGCCACGGATG	188	61
DMR IG	Paternelle	F – CGCTATGAACTACCGCTACG R – CGGCATTAGTACACGGCGAACCTCC	136	61
DMR Kcnql	Maternelle	F – TCGGTCGAGTCCCAAGGTGAGT R – ACAGCTACCACATAACAACACG	184	61
DMR Igf2R	Maternelle	F – GAGTTTTCTGTAGCCCAGAAATCTTCA R – TACGCGAGGTGAGGGTTCCACTGAT	127	61

Tableau 14 : Les amorces permettant l'analyse des DMR

pb : paire de bases ; DMR : région différentiellement méthylée ; T_a : température d'hybridation (Hiura *et al.*, 2010).

acide borique 89 mM, EDTA 20 mM). La sonication est répétée jusqu'à l'obtention de fragments dont la taille est comprise entre 200 et 600 paires de bases.

b. Immunoprécipitation de l'ADN

Chaque échantillon d'ADN analysé est immunoprécipité indépendamment par 3 anticorps différents :

- Anticorps monoclonal de souris anti-8-OHdG IgG2a (15A3, Novus Biologicals) ;
- Anticorps monoclonal de souris aspécifique IgG2a (MOPC173, Abcam) ;
- Anticorps monoclonal de souris anti-5-méthylcytosine IgG1 (33D3, Diagenode).

Une immunoprécipitation est également effectuée en absence d'anticorps. Chacune de ces 4 immunoprécipitations est réalisée en triple sur 4 µg d'ADN fragmenté pour chaque génotype analysé.

L'ADN est dénaturé par une incubation à 95°C pendant 10 minutes puis conservé à 4°C, avant d'être dilué dans le tampon d'immunoprécipitation (tampon 1X : phosphate de sodium 10 mM, pH 7, NaCl 140 mM, Triton X-100 0,05 %). Un échantillon de 10 % est prélevé et conservé : il constituera le contrôle de l'efficacité de la précipitation (*input*). L'ADN est incubé en présence de 2,5 µg d'anticorps pendant une nuit à 4°C, sous agitation constante.

Des billes magnétiques couplées à des protéines chimériques A/G (# 88802, Thermo Scientific) sont prélevées à 2 reprises avec le tampon d'immunoprécipitation 1X. 5 µL de billes sont alors ajoutés au mélange d'ADN et d'anticorps et incubés pendant 4 heures à 4°C. Les billes sont lavées 4 fois dans du tampon d'immunoprécipitation 1X pendant 5 minutes à 4°C sous agitation. L'ADN fixé sur les billes est ensuite élué et purifié à l'aide du kit IPure (Diagenode, Liège, Belgique), le kit étant appliqué en parallèle aux billes et à l'*input* correspondant. L'ADN précipité obtenu est conservé à -20°C.

Le contrôle de l'enrichissement en séquences méthylées par l'anticorps anti-5-méthylcytosine a été réalisé par PCR en utilisant les amorces décrites par le tableau 14, selon le protocole décrit au paragraphe § I.3.b. La quantification a été effectuée à l'aide du logiciel ImageJ 1.47n (NIH, USA).

3. Dot blot

a. ADN

L'ADN purifié est déposé sur une membrane de nylon chargée positivement Amersham Hybond-N+ (GE Healthcare Life Sciences) préalablement hydratée avec du tampon TE, à l'aide d'un appareil de *slot blot* à vide (PR 648 slot blot, Høfer). Chaque dépôt est à quantité égale d'ADN. Chaque puits de l'appareil est rincé par 500 µL de tampon TE. La membrane est alors séchée à l'air libre, puis l'ADN est hybridé de façon covalente à la membrane par une exposition de 1 minute aux UV. La membrane est réhydratée dans une solution saline de tampon Tris 1X (*Tris-buffered saline*, TBS 1X ; Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 150 mM) pendant 5 minutes. Elle est saturée pendant

1 heure à température ambiante dans du tampon de saturation (TBS 1X, 5 % lait), avant d'être lavée 2 fois pendant 5 minutes dans du TBS 1X, 0,5 % lait. La membrane est ensuite incubée pendant une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire anti-8-OHdG dilué dans le TBS 1X, 0,5 % lait (tableau 12). La membrane est lavée 3 fois pendant 5 minutes dans le TBS 1X, 0,5 % lait, puis elle est incubée pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à une HRP dilué dans le TBS 1X, 0,5 % lait (tableau 12). La membrane est lavée pendant 5 minutes, une première fois dans le TBS 1X, 0,5 % lait, 2 fois dans le TBS 1X, 2 fois dans le TBS 1X, Tween 20 0,2 % et 2 fois dans le TBS 1X. La membrane est révélée grâce au kit SuperSignal West Femto Substrate (Pierce, Thermo Scientific) selon les instructions du fabricant et photographiée dans l'imageur MF-ChemiBIS 3.2 (DNR Bio-Imaging Systems Ltd.). L'analyse et la quantification du signal sont effectuées à l'aide du logiciel ImageJ 1.47n (NIH, USA).

b. Chromatine

Les différentes fractions de chromatines sont déposées manuellement sur une membrane de nitrocellulose (Porablot NCL, Macherey-Nagel) à quantité égale de protéines totales. La membrane est séchée à l'air libre. La membrane est réhydratée dans du TBS 1X, puis saturée pendant 1 heure à température ambiante dans du TBS 1X, 0,1 % Tween 20, 0,5 % lait. La membrane est ensuite incubée pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon de saturation (tableau 12). Après 3 lavages de 10 minutes dans du TBS 1X, 0,1 % Tween 20, elle est incubée pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué dans le tampon de saturation (tableau 12). La membrane est lavée 3 fois pendant 10 minutes dans du TBS 1X, 0,1 % Tween 20, puis 1 fois pendant 10 minutes dans du TBS 1X. Le signal est révélé par électrochimiluminescence dans à l'aide d'un kit Western Lightning® Plus-ECL (Perkin Elmer) pour la protamine et TH2B et du kit SuperSignal West Femto Substrate (Pierce, Thermo Scientific) pour l'histone H3. Le signal émis est photographié dans l'imageur MF-ChemiBIS 3.2 (DNR Bio-Imaging Systems Ltd.). L'analyse et la quantification du signal sont effectuées à l'aide du logiciel ImageJ 1.47n (NIH, USA).

VIII. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism® 5.02. Les données sont représentées sous forme d'histogrammes représentant la moyenne avec la somme des écarts à la moyenne (SEM). Étant donné le petit nombre d'individus dans les groupes comparés ($3 < n < 9$), les données ont été analysées par des tests non paramétriques (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney), pour déterminer si les différences observées entre les groupes étudiés sont significatives ou non. Les données sont considérées comme significativement différentes si la valeur de p est inférieure à 0,05. Sur les graphiques, les résultats des tests statistiques sont indiqués par des étoiles selon les critères suivants :

- Aucune étoile : $p > 0,05$;
- 1 étoile (*) : $p < 0,05$;
- 2 étoiles (**) : $p < 0,01$;
- 3 étoiles (***) : $p < 0,001$

RÉSULTATS

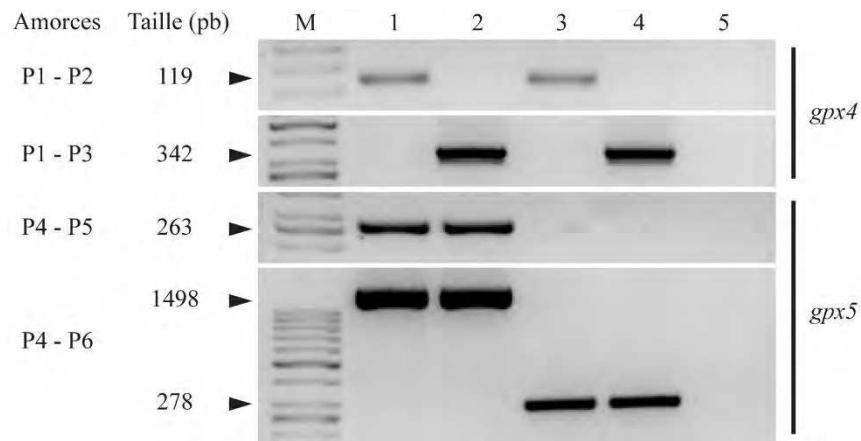


Figure 66 : Analyse génomique des modèles murins WT, *sngpx4*^{-/-}, *gpx5*^{-/-} et *sngpx4;gpx5*^{-/-}

Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des fragments d'ADNg amplifiés par PCR à l'aide des amorces décrites par la figure 62 et le tableau 6. Les couples d'amorces utilisés sont indiqués à gauche, suivi de la taille des fragments amplifiés (M : marqueurs de taille ; pb : paires de base). À droite est indiqué le gène amplifié chez les souris sauvages (1), *sngpx4*^{-/-} (2), *gpx5*^{-/-} (3) et DKO (*sngpx4;gpx5*^{-/-}, 4). Une PCR de contrôle est réalisée en absence d'ADNg (eau ultrapure, 5).

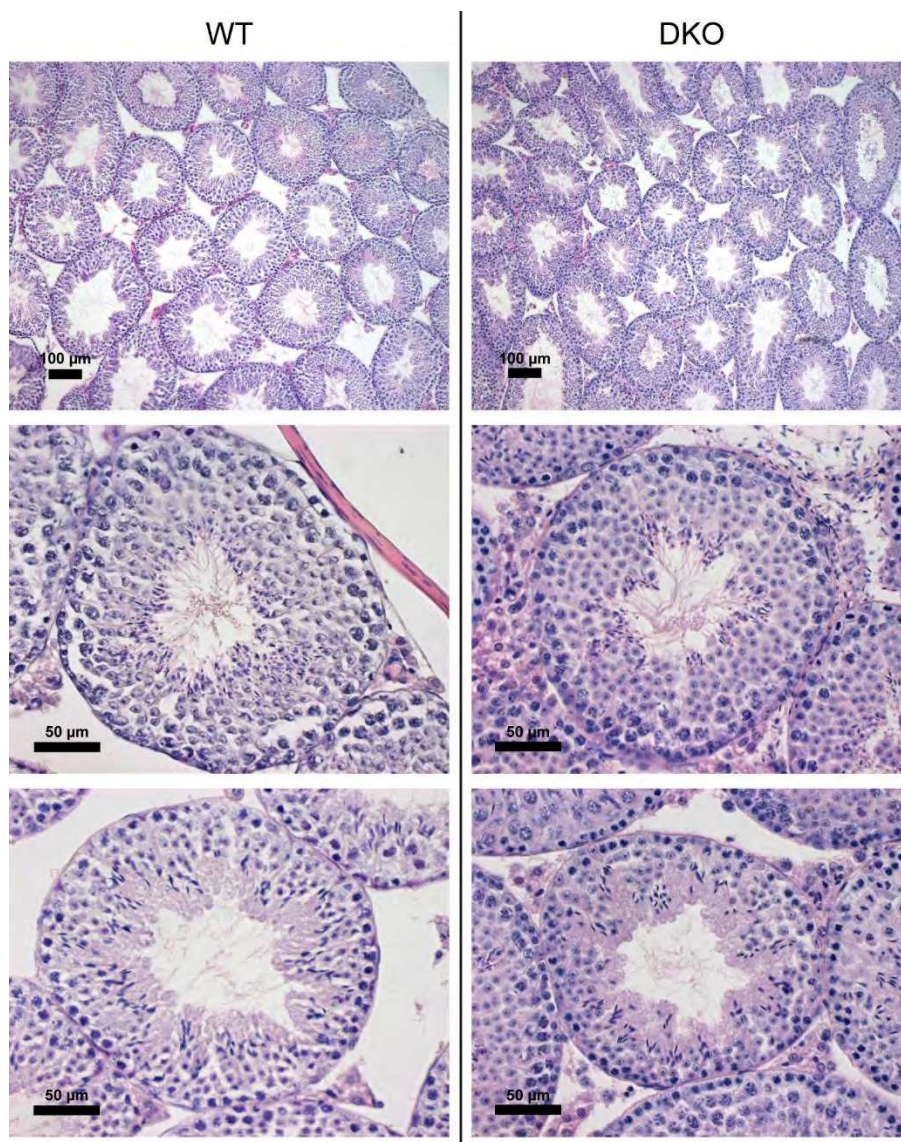


Figure 67 : L'analyse histologique des testicules

Les coupes histologiques de testicule des souris WT et DKO âgées de 8 mois ont été colorées par de l'hématoxyline et de l'éosine.

Cytoplasme : rose ;
Noyau : bleu.

I. La caractérisation phénotypique des souris *sngpx4;gpx5*^{-/-}

1. La validation du modèle murin *sngpx4;gpx5*^{-/-}

Les souris *sngpx4;gpx5*^{-/-} ont été générées par croisement entre les souris *sngpx4*^{-/-} (Conrad *et al.*, 2005), obtenues auprès du Dr. Marcus Conrad (Helmholtz Zentrum München, Centre de recherche allemand pour la Santé et l'Environnement, Munich, Allemagne), et les souris *gpx5*^{-/-} (Chabory *et al.*, 2009), générées dans un même fond génétique (C57Bl6) par notre équipe en collaboration avec la fondation de recherche ERSF du groupe pharmaceutique Ernst Schering AG (*Ernst Schering Research Foundation*, Berlin, Allemagne). Les souris *double knock-out* (DKO) obtenues sont homozygotes pour les allèles invalidés des deux gènes *gpx4* et *gpx5*.

Le gène *gpx4* reste en partie fonctionnel, mais il ne peut produire que les isoformes cytoplasmique et mitochondriale de la protéine GPx4. L'isoforme snGPx4, exprimée uniquement dans le noyau des spermatides lors de la spermiogenèse, n'est plus synthétisée car le gène EGFP suivi d'un codon « stop » a été inséré dans l'exon alternatif Ea, qui n'est transcrit que lors de la synthèse de l'isoforme nucléaire spermatique (figure 62A) (Conrad *et al.*, 2005).

Le gène *gpx5* n'est plus du tout fonctionnel car la totalité de l'exon 2 du gène a été éliminée (figure 62B). La délétion de cet exon entraîne la perte d'un des sites d'initiation de la traduction et un décalage de phase à l'origine de la production d'une protéine tronquée ne possédant pas de site actif. Cet allèle du gène ne produit donc plus de protéine GPx5 fonctionnelle (Chabory, 2009 ; Chabory *et al.*, 2009).

La validation du modèle DKO est effectuée par génotypage afin de vérifier la présence homozygote de l'allèle muté non fonctionnel pour chacun des deux gènes, *gpx4* et *gpx5*. L'ADN génomique est amplifié par PCR à l'aide de différentes amorces. Chacun des gènes est analysé par 2 couples d'amorces (figure 62 et le tableau 6), dont au moins une est située dans une région intronique, afin que seul l'ADN génomique soit amplifié. Les résultats obtenus pour chaque modèle de souris (*sngpx4*^{-/-}, *gpx5*^{-/-}, *sngpx4;gpx5*^{-/-}) sont présentés dans la figure 66.

2. L'analyse histologique de l'épididyme

Les deux protéines absentes chez les souris DKO sont normalement synthétisées dans les spermatides en élongation au sein du testicule (snGPx4) et dans l'épididyme des souris (GPx5). Nous avons donc vérifié l'intégrité de la structure de ces deux organes par des colorations de coupes histologiques de testicule (figure 67) et d'épididyme (figure 68) de souris sauvages (WT) et DKO âgées de 8 mois.

Les colorations à l'hématoxyline et à l'éosine réalisées sur les testicules des souris ne montrent aucune modification de l'organisation macroscopique du tissu chez les souris DKO de 8 mois comparées aux souris WT. La hauteur de l'épithélium du tubule séminifère et l'agencement

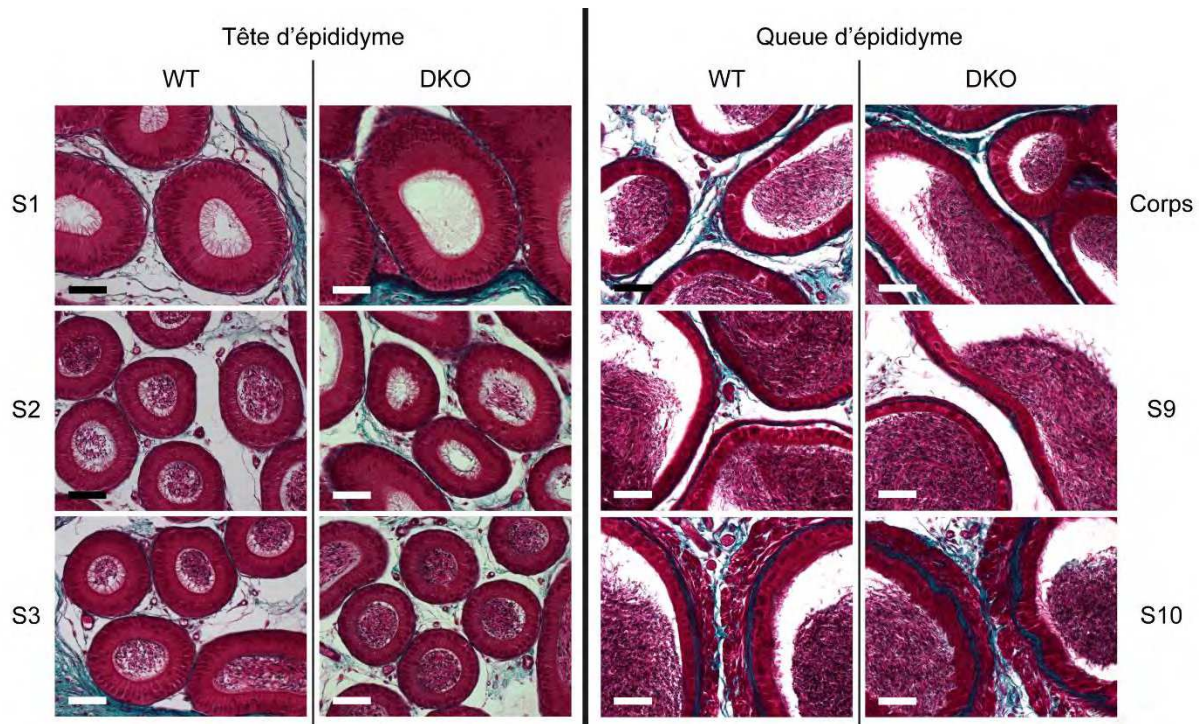


Figure 68 : L'analyse histologique de la tête et de la queue de l'épididyme

Des coupes histologiques de la tête et de la queue de l'épididyme des souris WT et DKO de 8 mois ont été colorées par la méthode du trichrome de Masson-Goldner. Les régions présentées sont les segments (S) 1, 2 et 3 de la tête de l'épididyme, la fin du S7 du corps de l'épididyme et les S9 et S10 de la queue de l'épididyme. Échelle : 50 μ m.

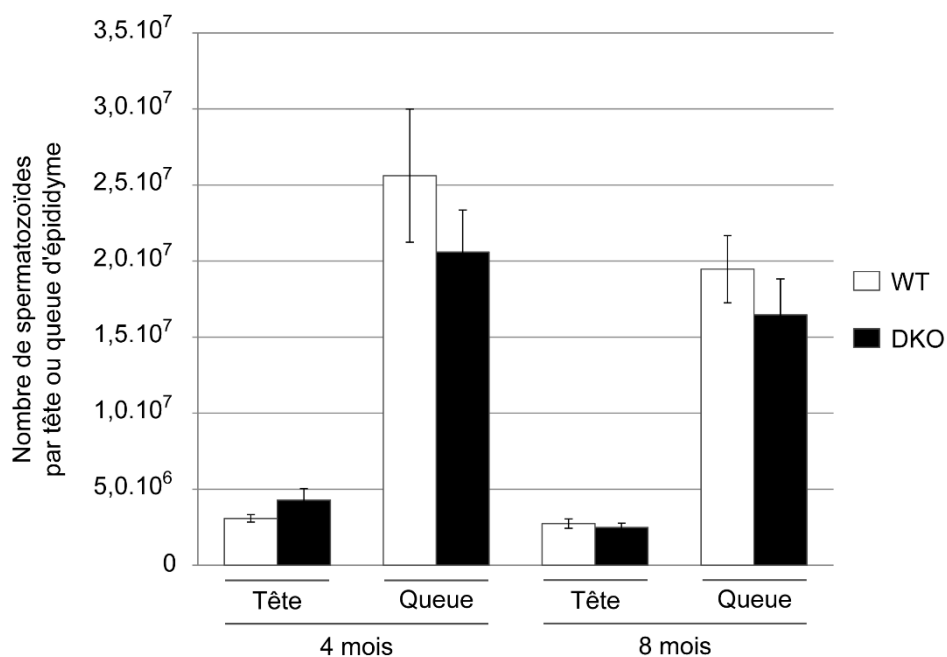


Figure 69 : La numération des spermatozoïdes en transit dans l'épididyme

Les spermatozoïdes extraits d'une tête ou d'une queue d'épididyme ont été comptés sur une cellule de Malassez. Ces comptages ont été réalisés chez les souris WT et DKO, à 4 et à 8 mois. n=5.

des cellules germinales en différenciation ne semblent pas altérés (figure 67), comme précédemment observé chez les souris *sngpx4*^{-/-} (Conrad *et al.*, 2005).

L'épithélium de la tête de l'épididyme des souris DKO présente une épaisseur d'environ 50 à 60 µm dans le segment 1, puis de 20 à 30 µm dans les segments 2 et 3. La lumière du tubule épидидymaire du segment 1 ne contient que rarement des spermatozoïdes, tandis qu'il y en a toujours dans les segments suivants. Les stéréocils au pôle apical des cellules de l'épithélium sont bien présents chez les souris DKO, avec une longueur similaire à ceux des souris WT (figure 68).

Dans la queue de l'épididyme, l'épaisseur de l'épithélium épидидymaire est moins importante, mesurant environ 10 µm, tandis que l'épaisseur de la couche de cellules musculaires lisses augmente considérablement par rapport à celle observée dans la tête de l'épididyme, multipliant parfois par 2 l'épaisseur de la paroi de l'épididyme, en particulier dans le segment 10. Les spermatozoïdes présents dans la lumière du tubule de la queue de l'épididyme sont beaucoup plus nombreux que dans les premiers segments et forment une masse amorphe très compacte (figure 68).

Ces caractéristiques morphologiques des tubules séminifères, ainsi que de la tête et de la queue de l'épididyme des souris DKO sont en tous points similaires à celles observées chez les souris WT au même âge, ainsi que chez les souris *gpx5*^{-/-} (Chabory *et al.*, 2009). L'absence de snGPx4 et GPx5 ne provoque donc pas de modifications morphologiques visibles de ces tissus.

3. L'analyse des paramètres spermatiques

Les paramètres spermatiques généraux ont ensuite été évalués.

a. La numération des gamètes

Lors de l'analyse des spermatozoïdes épидидymaires, les gamètes extraits des têtes et des queues d'épididyme ont été comptés en cellule de Malassez. Que ce soit à 4 ou à 8 mois, le nombre total de spermatozoïdes transportés dans la tête ou dans la queue de l'épididyme ne varie pas entre les souris WT et les souris DKO (figure 69).

Ce résultat, associé à l'absence de modification morphologique des tubules séminifères, semble indiquer une absence d'effet de l'invalidation de snGPx4 sur la spermatogenèse.

b. La morphologie des spermatozoïdes

➤ Les observations générales

La morphologie des spermatozoïdes de la tête et de la queue de l'épididyme a été évaluée à 4 mois à partir de frottis ayant subis une coloration de Shorr. Les gamètes présentant une pièce intermédiaire coudée (angle à 90°) ou en épingle à cheveux, ainsi que les spermatozoïdes présentant une tête géante ont été comptés.

En ce qui concerne le flagelle des spermatozoïdes, dans la tête de l'épididyme, aucun défaut n'est plus fréquent chez les souris DKO que chez les souris WT. Cependant, dans la queue de

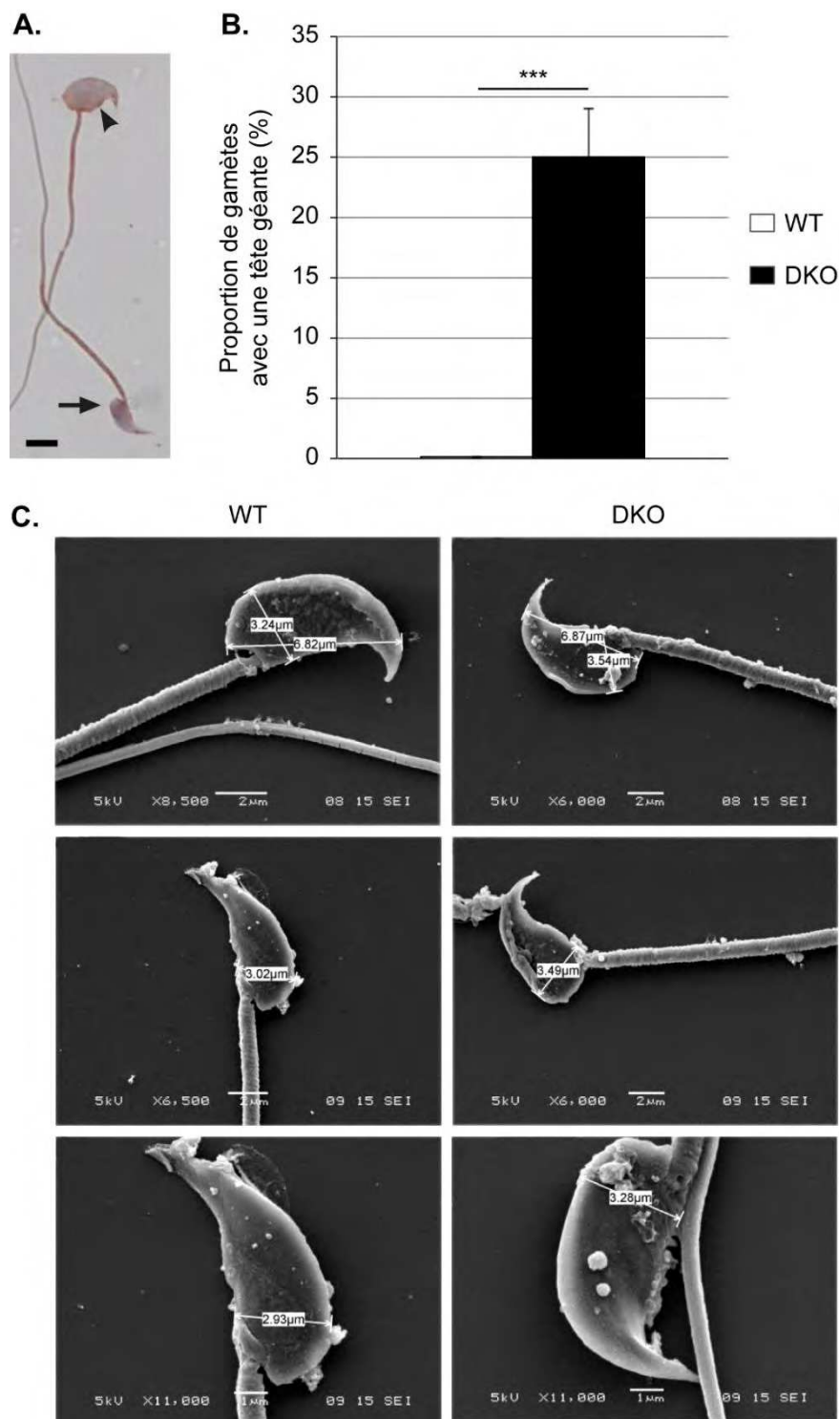


Figure 71 : La morphologie de la tête des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes issus de la tête et de la queue de l'épididyme de souris WT et DKO de 4 mois ont été colorés avec du colorant de Shorr (A), puis les gamètes présentant une tête « géante » (tête de flèche, ►) en comparaison aux gamètes normaux (flèche, →) ont été comptabilisés dans la tête de l'épididyme (B, n=5). Les spermatozoïdes de la tête de l'épididyme de souris WT et DKO sont observés par MEB (C, n=5), puis la tête de ces gamètes est mesurée. n=5. *** : $p < 0,001$.

l'épididyme, une augmentation du nombre de spermatozoïdes possédant une pièce intermédiaire coudée a été observée chez les souris DKO (figure 70A). L'observation de ce type de gamète par microscopie électronique à balayage (MEB) a permis de déterminer que ce coude n'est pas associé à une rétention anormale de cytoplasme, mais probablement à un défaut de la structure interne de la pièce intermédiaire au niveau des mitochondries et/ou des microtubules (figure 70B).

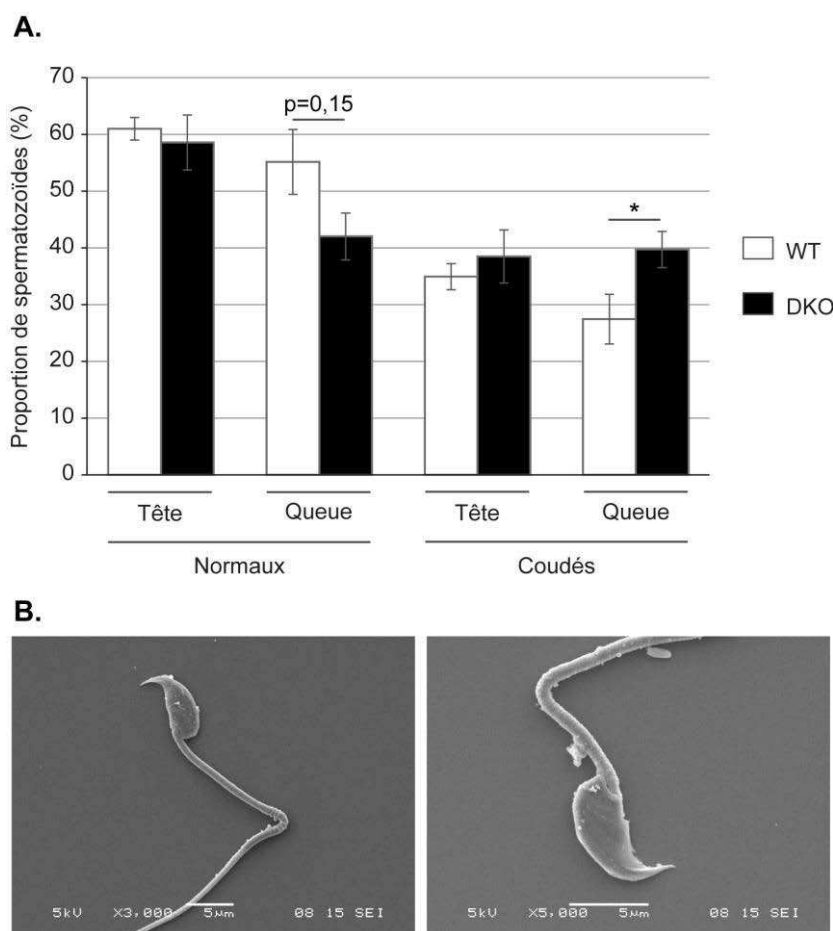


Figure 70 : La morphologie du flagelle des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes issus de la tête et de la queue de l'épididyme de souris WT et DKO de 4 mois ont été colorés avec du colorant de Shorr, puis la morphologie de la pièce intermédiaire a été observée afin de rechercher la fréquence de certaines caractéristiques, dont la présence d'un flagelle normal, celle d'un coude à 90° dans la pièce intermédiaire (B, observation par microscopie électronique à balayage) et celle d'un flagelle « en épingle à cheveux ». n=5. * : $p < 0,05$.

Néanmoins, le principal défaut des spermatozoïdes des souris DKO se situe au niveau de la tête spermatique. En effet, environ 25 % des spermatozoïdes dans la tête de l'épididyme présentent une tête géante sur les frottis colorés par la coloration de Shorr, alors qu'il n'y en a presque aucun chez les souris WT (figure 71A-B). Ce défaut avait déjà été observé dans les mêmes proportions chez les souris *sngp4^{-/-}*, lorsque les spermatozoïdes étaient soumis à un cycle de séchage/réhydratation, ce qui est également le cas lors de la coloration de Shorr sur des frottis séchés à l'air libre (Conrad *et al.*, 2005). L'observation par MEB des gamètes ne montre pas ce type de gonflement démesuré de la tête du spermatozoïde. Seuls quelques spermatozoïdes des souris DKO semblent présenter une légère augmentation de la taille de la tête (figure 71C). Les

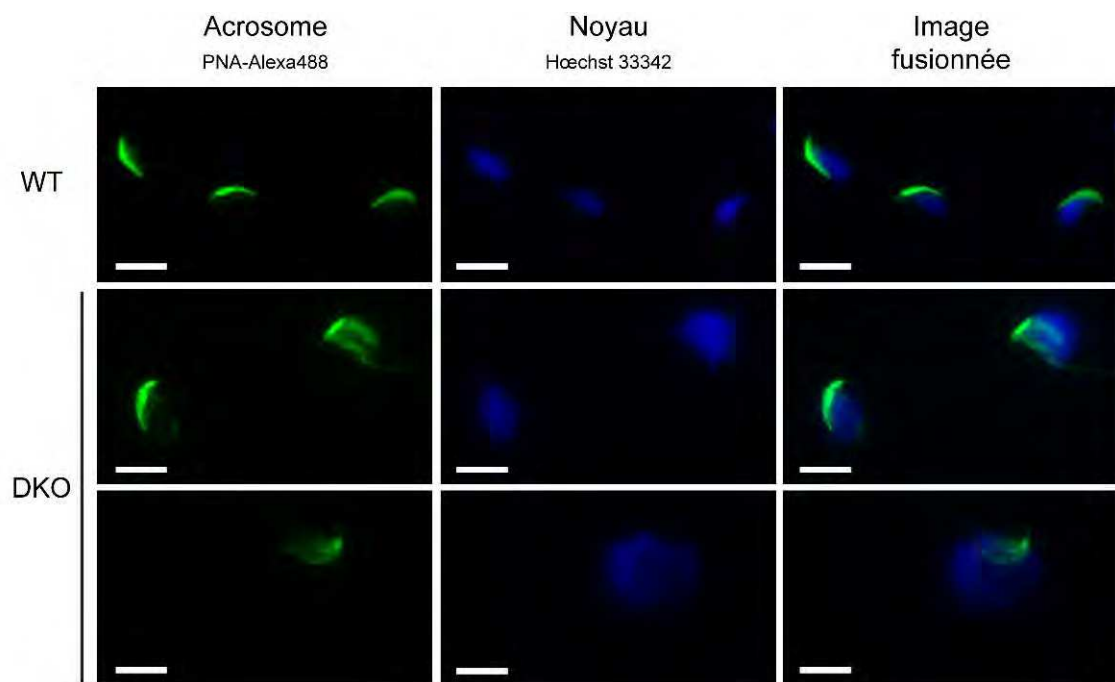


Figure 72 : La morphologie du noyau et de l'acrosome des spermatozoïdes issus de la tête de l'épididyme des souris WT et DKO

Des sondes fluorescentes ont été utilisées pour visualiser le noyau (Hœchst 33342) et l'acrosome (lectine *peanut agglutinin* [PNA] couplée à de l'Alexa488) de spermatozoïdes de la tête de l'épididyme de souris WT et DKO de 8 mois.

spermatozoïdes observés en MEB n'ayant pas subi de cycle de réhydratation, ceci sous-entend que ce phénotype de tête géante n'est pas une macrocéphalie présente *in situ*, mais un effet du stress subit par les spermatozoïdes lors du protocole de coloration. Il faut noter cependant que ces spermatozoïdes sensibles présentant une tête géante lors de la coloration de Shorr ne sont pas retrouvés dans la queue de l'épididyme.

L'absence de snGPx4 et GPx5 a donc un effet sur la morphologie du flagelle des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes à tête géante observés en coloration de Shorr chez les souris *sngpx4*^{-/-} et DKO ne sont pas des spermatozoïdes macrocéphales, mais démontrent une plus grande susceptibilité des gamètes face à un stress hydrique. Cependant, cette fragilité semble corrigée lors de la maturation épидидymaire puisqu'elle n'est pas observée pour les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme des souris DKO.

➤ ***L'analyse par fluorescence des différents compartiments de la tête des spermatozoïdes***

Afin de connaître les compartiments de la tête spermatique touchés par cette augmentation de volume lors d'une réhydratation, des frottis de spermatozoïdes issus de la tête de l'épididyme des souris DKO ont été marqués par deux sondes fluorescentes. La première est le Hœchst 33342, un intercalant de l'ADN, qui permet de visualiser le noyau. La deuxième sonde est de l'Alexa488 couplé à du PNA (*peanut agglutinin*), une lectine qui est capable de se fixer sur la membrane externe de l'acrosome et permet donc de s'assurer de la présence et de la forme de l'acrosome.

L'observation de ces spermatozoïdes à tête géante marqués par ces sondes a permis de se rendre compte que seul le noyau du gamète est responsable de l'augmentation de volume (figure 72). L'acrosome de ces spermatozoïdes est non seulement toujours présent mais garde une forme et une taille quasi normales. Selon les spermatozoïdes à tête géante et la façon dont le noyau s'est étendu, l'acrosome est soulevé ou poussé sur le côté (figure 72). Le marquage de l'ADN et de l'acrosome couvrant la totalité de la surface de la tête spermatique, il semble que le compartiment cytoplasmique n'augmente pas de volume lors de la réhydratation.

L'absence de snGPx4 dans le noyau des spermatozoïdes provoque donc une fragilité du noyau spermatique, alors plus prompt à se décondenser. Cette expansion de l'ADN spermatique semble ainsi suggérer un défaut de structuration de la chromatine spermatique.

Les paramètres spermatiques des souris DKO sont peu modifiés. En effet, le nombre de spermatozoïdes en transit dans l'épididyme est identique à celui des souris WT. Une augmentation du nombre de spermatozoïdes présentant un angle dans la pièce intermédiaire du flagelle a été observée chez les souris DKO. De plus, dans la tête de l'épididyme, la présence de spermatozoïdes avec une tête géante a été relevée après un cycle de déshydratation/réhydratation. Cette augmentation de la taille de la tête des spermatozoïdes, qui n'est pas observée dans la queue de l'épididyme, est associée à une augmentation de la taille du noyau, probablement en lien avec un défaut de condensation de la chromatine spermatique.

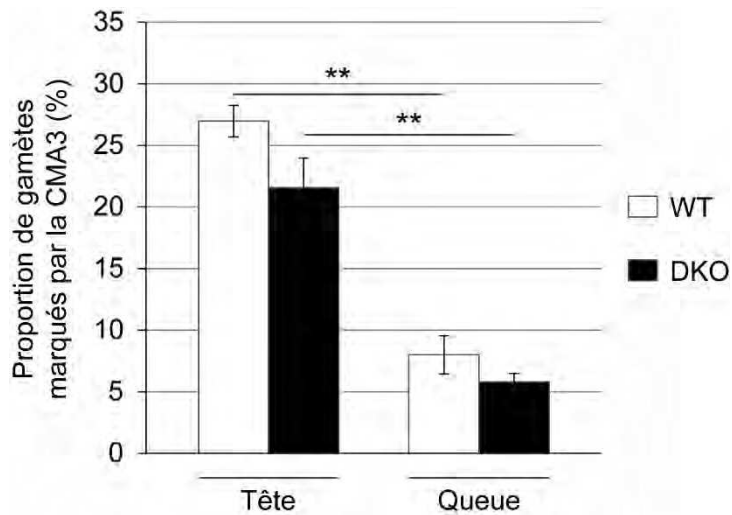


Figure 73 : L'évaluation de la condensation de la chromatine spermatique par cytométrie en flux

Les spermatozoïdes épидидymaires de souris WT et DKO âgées de 4 mois sont marqués par la chromomycine A3, un intercalant de l'ADN, puis analysés par cytométrie en flux, afin de mesurer la condensation de la chromatine. n=5. ** : $p < 0,01$.

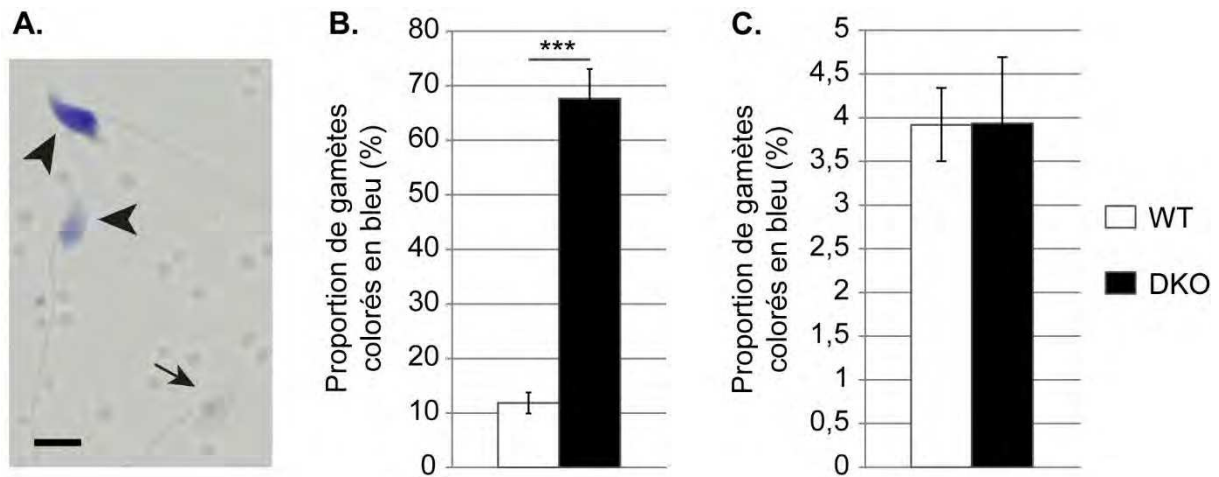


Figure 74 : L'évaluation de la condensation de la chromatine spermatique par coloration sur frotti

Les spermatozoïdes épидидymaires de souris WT et DKO de 4 mois sont colorés au bleu de toluidine. Les spermatozoïdes non ou peu colorés possèdent un ADN condensé (flèche, →), alors que ceux colorés possèdent un ADN peu condensé (tête de flèche, ▶) (A, échelle : 5 μm). Les spermatozoïdes peu condensés ont été comptés dans la tête (B) et dans la queue de l'épididyme (C). n=5. *** : $p < 0,001$.

4. L'effet de la double invalidation sur la maturation de la chromatine spermatique

a. La structure de la chromatine

Étant donné la fragilité du noyau spermatique chez 25 % des spermatozoïdes de la tête d'épididyme et le rôle supposé de snGPx4 dans le pontage disulfure entre les protamines (Pfeifer *et al.*, 2001 ; Conrad *et al.*, 2005), la condensation de la chromatine spermatique a été analysée par diverses techniques, ainsi que le contenu en thiols libres des spermatozoïdes, chez des souris WT et DKO de 4 mois.

➤ *L'insertion de la chromomycine A3 et du bleu de toluidine*

La condensation de la chromatine peut être analysée par l'utilisation de molécules capables de marquer l'ADN. Ainsi, le bleu de toluidine est un colorant, auquel sa charge positive et son caractère basique confère une forte affinité pour l'ADN, tandis que la chromomycine A3 (CMA3) est un fluorochrome qui s'intercale dans l'ADN et plus particulièrement dans les séquences riches en G et C. Dans les deux cas, plus la chromatine est condensée, moins les molécules peuvent interagir avec l'ADN.

Comme attendu, lorsqu'on compare les gamètes de la tête et la queue de l'épididyme, une diminution très significative de l'insertion de la CMA3 dans le noyau spermatique est observée chez les souris WT ($26,97 \pm 1,28$ % *vs* $8,00 \pm 1,54$ %) comme chez les souris DKO ($21,56 \pm 2,42$ % *vs* $5,79 \pm 0,70$ %) (figure 73). Ceci indique une augmentation de la condensation de la chromatine spermatique lors du transit épидидymaire, ce qui est un fait établi (Krzanowska, 1982 ; Evenson *et al.*, 1986, 1989 ; Yossefi *et al.*, 1994 ; Golan *et al.*, 1996). Aucune différence n'est toutefois observée entre les spermatozoïdes des souris WT et ceux des souris DKO, que ce soit dans la tête ou dans la queue de l'épididyme.

Cependant, la coloration des gamètes par le bleu de toluidine montre une augmentation importante de la proportion de spermatozoïdes colorés dans la tête de l'épididyme des souris DKO ($67,66 \pm 5,39$ %) en comparaison des souris WT ($11,85 \pm 1,90$ %) (figure 74). Cette différence n'est pas présente pour les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme. La coloration du noyau spermatique par le bleu de toluidine confirme donc que la chromatine spermatique des spermatozoïdes de tête d'épididyme des souris DKO présente un défaut de condensation, qui semble corrigé lors du transit épидидymaire puisque cette anomalie n'est pas retrouvée dans les gamètes de la queue de l'épididyme.

La différence de résultat obtenu entre le marquage par la CMA3 en cytométrie en flux et la coloration au bleu de toluidine provient probablement à nouveau du fait que les spermatozoïdes restent en suspension tout au long du protocole de cytométrie en flux, alors qu'ils sont soumis à un cycle de déshydratation/réhydratation lors de la réalisation de la coloration au bleu de toluidine. Ainsi, l'ensemble de ces résultats confirme la plus grande fragilité de la structure de la chromatine spermatique des spermatozoïdes de la tête de l'épididyme des souris DKO par rapport à ceux des souris WT, entraînant une décondensation de cette chromatine lorsqu'elle est soumise à un stress hydrique.

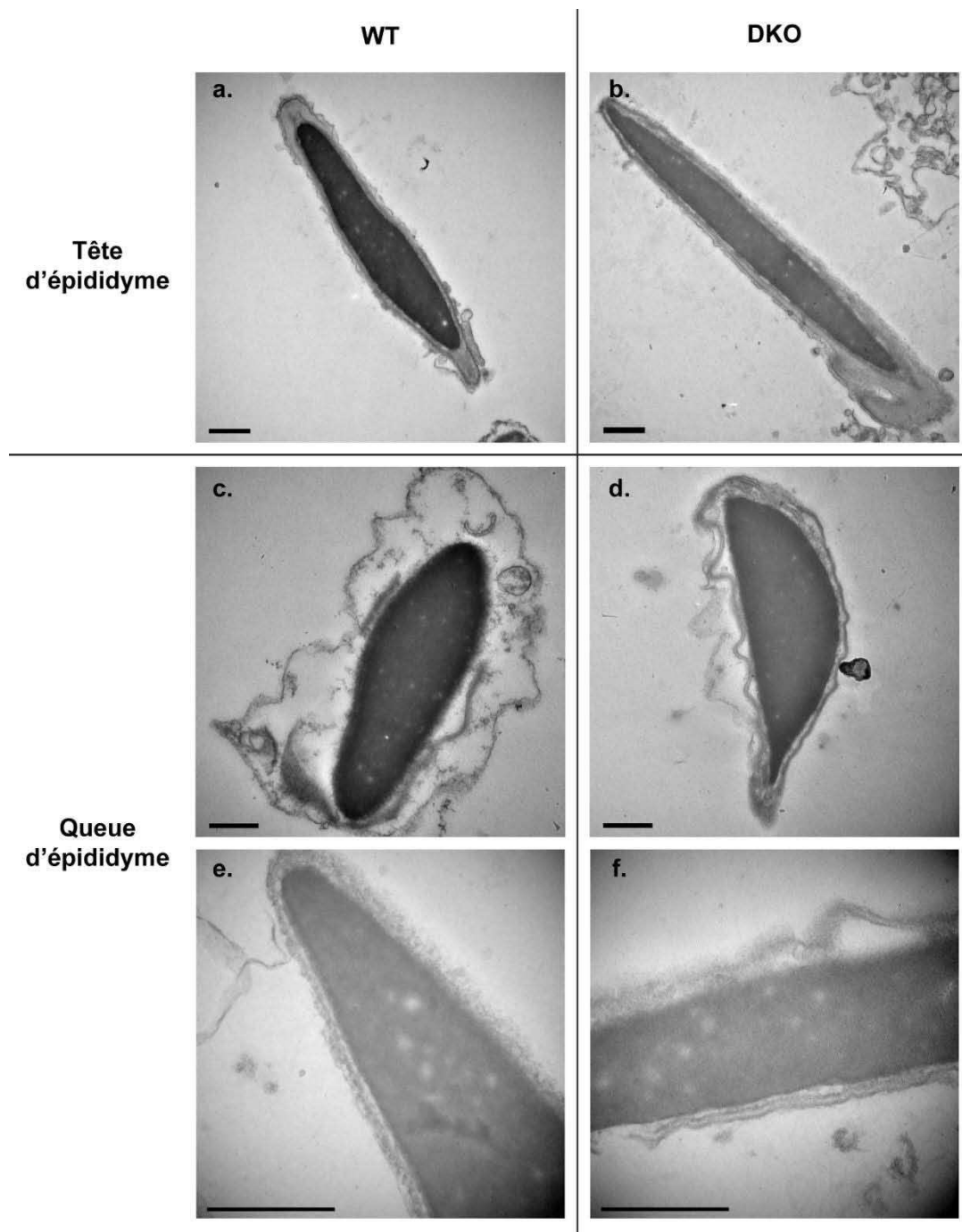


Figure 75 : L'observation de la chromatine des spermatozoïdes par MET

Des coupes de spermatozoïdes issus de la tête (a, b) et de la queue de l'épididyme (c, d, e, f) chez des souris WT (a, c, e) et DKO (b, d, f) sont observées par MET. Échelle : 500 nm. Grossissement : a-b, x26 800 ; c-d, x32 100 ; e-f, x104 000.

➤ ***L'observation du noyau spermatique par microscopie électronique à transmission***

Les défauts de condensation de la chromatine peuvent parfois être observés par microscopie électronique à transmission (MET). Dans ce cas, le noyau spermatique présente généralement des « lacunes » au sein de la structure très compacte de la chromatine (figure 30I-J). Les spermatozoïdes de la tête et de la queue de l'épididyme des souris WT et DKO ont donc été observés par MET (figure 75). Cette observation n'a pu mettre en évidence aucune modification visible de la structure générale de la chromatine spermatique chez les souris DKO par rapport aux souris WT. Le nombre et la taille des lacunes observables dans la chromatine sont variables entre les gamètes d'un même individu, mais de façon générale, ils ne sont pas modifiés entre les spermatozoïdes des souris WT et ceux des souris DKO.

➤ ***Le contenu en groupements thiols libres***

La fragilité de la chromatine des spermatozoïdes de la tête de l'épididyme des souris DKO face à un stress hydrique peut suggérer toutefois qu'il existe des différences au niveau moléculaire entre la chromatine spermatique des souris WT et DKO. Étant donné le rôle confié à snGPx4 dans le pontage disulfure entre les protamines lors de la condensation de la chromatine spermatique, le contenu en thiols libres des spermatozoïdes a été analysé par l'utilisation de monobromobimane (mBrB) en cytométrie en flux. Le mBrB réagit avec les thiols libres en émettant de la fluorescence. Ainsi, plus la fluorescence est intense, plus la quantité de thiols libres est importante.

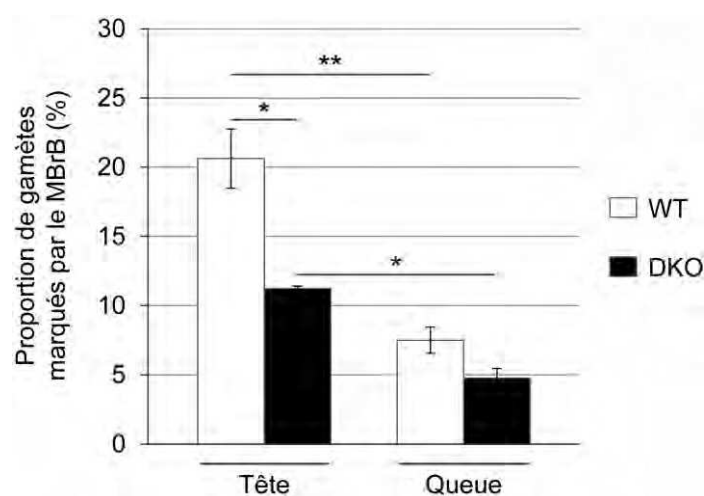


Figure 76 : Le contenu en thiols libres des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes de souris âgées de 4 mois sont incubés avec du monobromobimane (mBrB), qui fluoresce lorsqu'il réagit avec des thiols libres. Cette fluorescence est ensuite analysée par cytométrie en flux. n=5. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

Chez des animaux âgés de 4 mois, les résultats obtenus indiquent que les spermatozoïdes de la tête de l'épididyme des souris DKO contiennent significativement moins de thiols libres ($11,23 \pm 0,19$ % de spermatozoïdes positifs au mBrB) que ceux des souris WT ($20,62 \pm 2,14$ % de spermatozoïdes positifs au mBrB), ce qui sous-entend que le nombre de ponts disulfures dans ces spermatozoïdes est plus important (figure 76). Ce résultat est contraire à celui attendu. Dans la

Gène	Tête		Queue	
	Significativité	Facteur	Significativité	Facteur
<i>txn1</i>		=	*	+ 1,47
<i>txn2</i>		=		=
<i>txn1</i>	**	+ 1,26		=
<i>txndc2 (sptrx1)</i>		=		=
<i>txndc3 (sptrx2)</i>		=		=
<i>txndc8 (sptrx3)</i>		=		=
<i>pdia3 (erp57)</i>		=	*	+ 1,56
<i>pdia4 (erp72)</i>		=		=
<i>pdia5</i>	p = 0,0556	+ 1,28	*	+ 1,44
<i>pdia6 (txndc7)</i>	**	+ 1,36	p = 0,0556	+ 1,15
<i>pdia10 (txndc4)</i>	**	+ 1,31	**	+ 1,3
<i>pdia11 (txndc1)</i>		=	*	+ 1,22

Tableau 15 : L'expression des gènes codant des protéines à activité disulfide isomérase

La quantité d'ARNm produit par chaque gène a été déterminée par RT-Q-PCR, de façon relative à la quantité d'ARNm de la cyclophiline B. L'analyse a été réalisée à partir d'extraits d'ARNm de tissus de la tête et de la queue d'épididyme de souris âgées de 4 mois (n=5). Les différences significatives d'expression ou celles présentant une forte tendance entre les souris sauvages et DKO sont indiquées par la présence d'un symbole + ou – suivi par le facteur d'augmentation ou de diminution de l'expression, respectivement, chez les souris DKO par rapport aux souris WT. Un signe = indique une différence d'expression non significative. * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01.

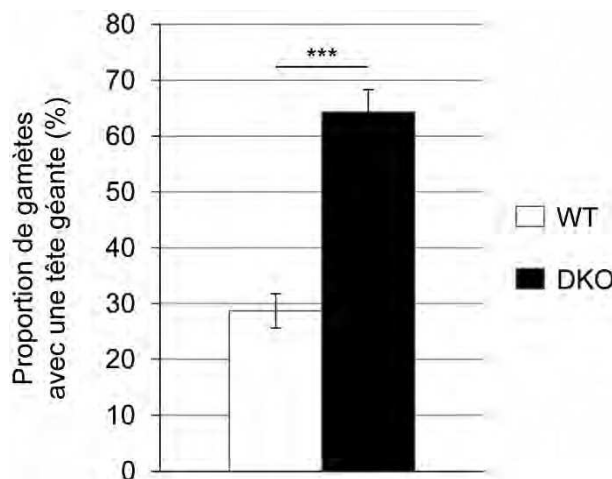


Figure 77 : La sensibilité des spermatozoïdes à des conditions réductrices

Les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme sont incubés avec un tampon réducteur (PBS 1X, DTT 2 mM, Triton X-100 0,1 %) induisant une décondensation de la chromatine spermatique. Suite à une coloration de Shorr, le nombre de spermatozoïdes présentant une tête géante est compté. n=5. *** : p < 0,001.

queue de l'épididyme, aucune différence significative n'est observée entre les souris WT et DKO. Cependant, il semble qu'il y ait tout de même une tendance à la diminution du contenu en thiols libres dans les spermatozoïdes des souris DKO par rapport aux souris WT (Mann-Whitney : $p = 0,13$; t test : $p = 0,04$).

b. L'expression épидидymaire des gènes des protéines disulfide isomérases

Afin de comprendre cette différence de contenu en thiols libres dans les spermatozoïdes des souris DKO par rapport aux souris WT, l'expression des gènes codant pour différentes enzymes à activité disulfide isomérase a été analysée dans la tête et la queue de l'épididyme des souris WT et DKO à 4 mois (tableau 15).

Les résultats indiquent que plusieurs de ces enzymes sont significativement plus exprimées chez les souris DKO que chez les souris WT, dès la tête de l'épididyme. Dans la tête de l'épididyme, ces gènes sont *txn1l*, *pdia6* et *pdia10*. De plus, l'expression du gène *pdia5* présente une tendance à l'augmentation chez les souris DKO par rapport aux souris WT. L'augmentation de leur expression est de 26 à 36 % selon les gènes. Dans la queue de l'épididyme, l'expression des gènes *pdia3*, *pdia5*, *pdia10* et *pdia11* est significativement plus importante chez les souris DKO par rapport aux souris WT et l'expression du gène *pdia6* présente aussi une tendance à l'augmentation. L'augmentation de cette expression est plus forte que dans la tête puisqu'elle va de 22 à 56 %, avec 2 gènes montrant une augmentation de l'expression supérieure à 40 %. De plus, dans la queue de l'épididyme, l'expression du gène *txn1* codant pour la Trx1 est significativement augmentée de 47 % chez les souris DKO par rapport aux souris WT. Or, Trx1 est impliquée dans la régénération du site actif des enzymes à activité disulfide isomérase.

Ces résultats semblent indiquer que l'épididyme tente de compenser l'absence de la protéine snGPx4, afin de maintenir l'activité de pontage disulfure dans les spermatozoïdes. Au vu de la diminution du contenu en thiols libres des spermatozoïdes DKO, il semble que la formation de ponts disulfures ne soit pas seulement maintenue mais qu'elle dépasse celle observée chez les souris WT.

c. La sensibilité des spermatozoïdes aux conditions réductrices

Lors des expérimentations précédentes, les spermatozoïdes de la queue d'épididyme des souris DKO n'ont montré aucune modification par rapport aux souris WT. Afin de s'assurer que l'absence de snGPx4 n'a pas modifié le pontage disulfure chez les gamètes des souris DKO, les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme ont été soumis à un traitement réducteur (DTT 2 mM et Triton X-100 0,1 %), capable de réduire les ponts disulfures. Après une heure d'incubation, le traitement est éliminé et un frotti de spermatozoïdes est réalisé. Les gamètes sont ensuite observés au microscope optique, suite à une coloration de Shorr.

À 4 mois, chez les souris WT, comme sur les souris DKO, des spermatozoïdes présentent une tête géante similaire à celle observées dans la tête de l'épididyme après une coloration de Shorr (figure 71A). Ces spermatozoïdes sont comptés. Les résultats indiquent que le nombre des gamètes avec une tête géante après 1 heure de décondensation est doublé chez les souris DKO ($64,31 \pm 4,00$ %) par rapport aux souris WT ($28,70 \pm 3,06$ %) (figure 77). Les spermatozoïdes de

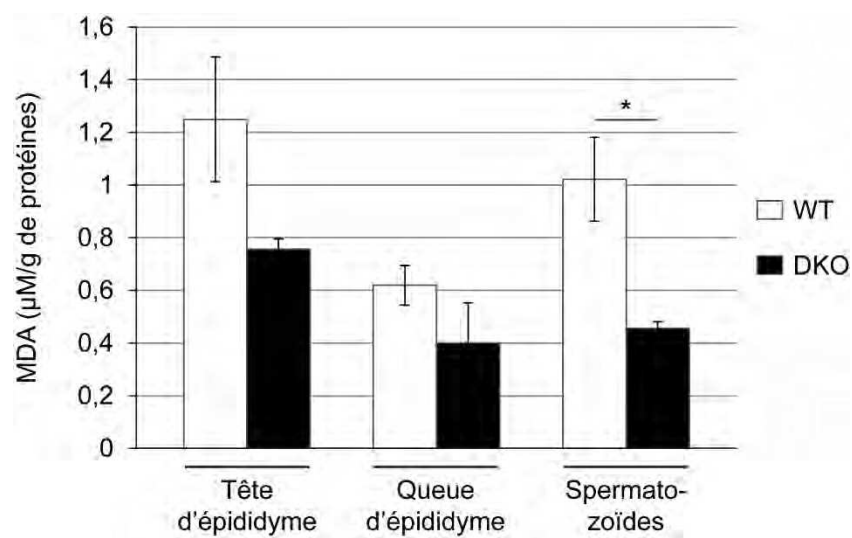


Figure 78 : L'évaluation de la peroxydation lipidique

Les produits de la peroxydation lipidique réagissant avec l'acide thiobarbiturique sont dosés par mesure de la fluorescence. Les résultats obtenus à partir des tissus de la tête et de la queue de l'épididyme, ainsi que des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme sont exprimés en concentration relative de malondialdéhyde (MDA). n=3. * : $p < 0,05$.

la queue de l'épididyme des souris DKO présentent donc une sensibilité plus importante à des conditions réductrices que les spermatozoïdes des souris WT.

Les spermatozoïdes des souris DKO présentent des défauts de condensation de la chromatine, en particulier dans la tête de l'épididyme. Les gamètes issus de la queue de l'épididyme, bien que non sensibles à un stress hydrique, sont tout de même sensibles à des conditions réductrices. Ces défauts ne sont pas associés à une diminution globale du pontage disulfure comme attendue en absence de snGPx4. Au contraire, le contenu en thiols libres dans les spermatozoïdes des souris DKO est significativement diminué, probablement grâce à l'augmentation de l'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes à activité disulfide isomérase.

5. Les effets de la double invalidation sur le statut redox au sein de l'épididyme

Des travaux antérieurs ont montrés que l'invalidation simple du gène codant pour l'enzyme GPx5 cause une augmentation du stress oxydant dans l'épididyme des souris (Chabory, 2009 ; Chabory *et al.*, 2009). La présence d'un tel stress oxydant a donc été recherchée dans l'épididyme et les spermatozoïdes épидидymaires des souris DKO.

a. La peroxydation lipidique

Parmi les composants cellulaires les plus réactifs avec les EOR, se trouvent les lipides membranaires. Les lipides insaturés qui composent les membranes sont entraînés dans une réaction en chaîne lorsqu'ils sont oxydés par les EOR. Cette réaction en chaîne provoque la formation d'un nombre important de molécules dont certaines sont très toxiques pour les cellules, comme le malondialdéhyde (MDA). Plusieurs de ces molécules, dont le MDA, ont la capacité de réagir avec l'acide thiobarbiturique en formant un composé fluorescent. Les tissus épидидymaires et les spermatozoïdes de souris WT et DKO de 4 mois ont donc été traités avec de l'acide thiobarbiturique, afin de déterminer par mesure de la fluorescence leur concentration en composés issus de la peroxydation lipidique (figure 78).

Les résultats obtenus indiquent, contre toute attente, une tendance à la diminution de la production des produits finaux de la peroxydation lipidique dans les tissus de la tête et de la queue de l'épididyme, ainsi qu'une diminution avérée de la peroxydation lipidique dans les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme chez les souris DKO ($0,46 \pm 0,02 \mu\text{m}$ de MDA/g de protéines totales) par rapport aux souris WT ($1,02 \pm 0,16 \mu\text{m}$ de MDA/g de protéines totales).

b. Les dommages oxydants de l'ADN spermatique

L'ADN est également très sensible aux EOR. De plus, dans les spermatozoïdes, l'intégrité de ce matériel nucléaire est de la plus haute importance lors du développement embryonnaire qui suit la fécondation. Les dommages oxydants présents sur l'ADN spermatique ont donc été évalués chez les souris DKO, à la fois directement (présence de bases oxydées) et par l'évaluation de leurs effets (fragmentation des brins).

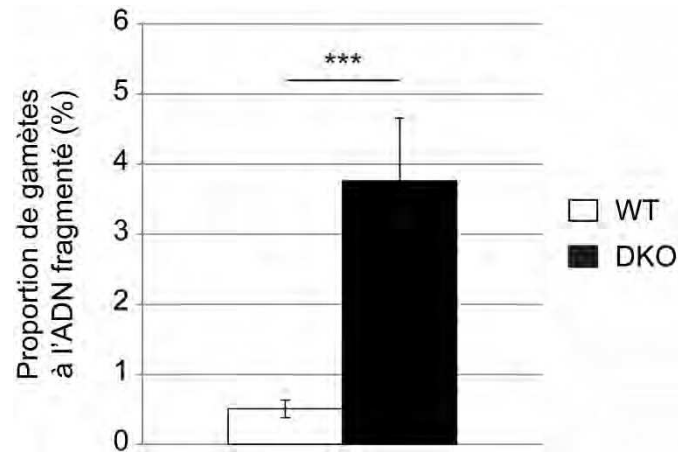


Figure 79 : L'évaluation de la fragmentation de l'ADN spermatique

La fragmentation de l'ADN spermatique a été quantifiée grâce au kit Halomax® (Halotech DNA SL, Madrid, Espagne) sur les spermatozoïdes issus de la queue de l'épididyme de souris de 4 mois. n=5. *** : $p < 0,001$.

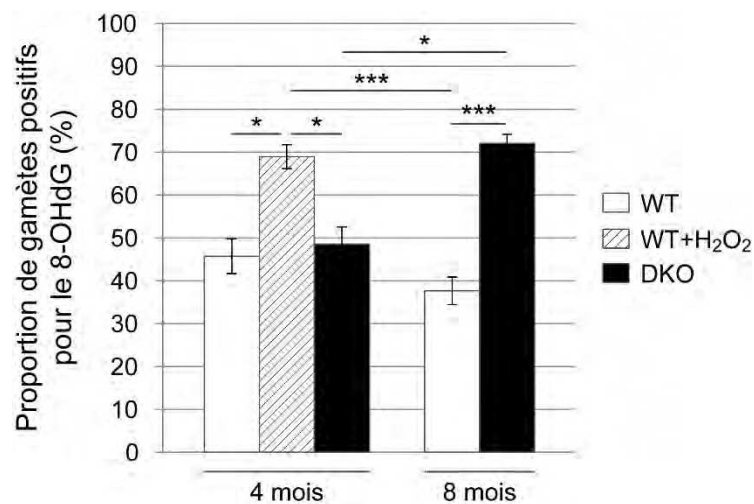


Figure 80 : L'évaluation de l'oxydation de l'ADN spermatique

Les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme de souris de 4 et 8 mois sont analysés par immunocytochimie, afin de détecter le 8-OHdG, un marqueur de l'oxydation de l'ADN. Des spermatozoïdes WT sont soumis à une incubation avec du peroxyde d'hydrogène afin de servir de contrôle positif du marquage. Les gamètes positifs pour le marquage anti-8-OHdG sont comptabilisés. n=5. * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$.

➤ **La fragmentation de l'ADN**

L'oxydation de l'ADN spermatique peut conduire à la formation de cassures simples ou double brin. La fragmentation de l'ADN spermatique des souris WT et DKO de 4 mois a donc été analysée grâce au kit Halomax® (Halotech DNA SL, Madrid, Espagne), basé sur la technique de dispersion de la chromatine spermatique (*Sperm Chromatin Dispersion Test* [SCD], Fernández *et al.*, 2003).

Ces analyses ont montré que la fragmentation de l'ADN spermatique est significativement plus élevée chez les souris DKO que chez les souris WT (figure 79). Le fait que la proportion de spermatozoïdes dont l'ADN est fragmenté n'excède pas 1 % chez les souris WT et 4 % chez les souris DKO est probablement dû à un problème de sensibilité du kit Halomax®.

➤ **La présence de résidus 8-OHdG**

Un des produits de l'oxydation de l'ADN est la 7,8-dihydro-8-oxo-2'-déoxyguanosine (8-OHdG), qui est une des formes de la guanine oxydée. La 8-OHdG peut être détectée par un anticorps qui le reconnaît spécifiquement. L'oxydation de l'ADN a donc été détectée par immunocytochimie sur des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme de souris WT et DKO âgées de 4 et 8 mois. Afin de permettre aux anticorps anti-8-OHdG d'atteindre leur cible au cœur du noyau, l'ADN spermatique est préalablement décondensé par un mélange de DTT et de Triton X-100. Une partie des spermatozoïdes des souris WT est également traitée avec 7 mM de H₂O₂ pendant 2 heures avant l'étalement sur lame, afin de constituer un contrôle positif du marquage 8-OHdG. Les spermatozoïdes présentant un marquage en biais à la base du noyau sont considérés comme positivement marqués.

Les résultats de cet immunomarquage indiquent que 45 % des spermatozoïdes issus des souris WT âgées de 4 mois présentent un marquage par l'anticorps anti-8-OHdG (figure 80). Si ces mêmes spermatozoïdes sont préalablement traités avec de l'H₂O₂, la proportion de gamètes positifs au marquage monte à 69 %. Ces chiffres sont approximativement identiques chez des souris WT âgées de 8 mois. Chez les souris DKO, à 4 mois, les spermatozoïdes ne sont pas plus de 48 % à présenter un marquage, ce qui est similaire à ce qui est observé chez les souris WT, alors que 72 % des gamètes possèdent un ADN oxydé détectable par l'anticorps anti-8-OHdG chez les souris DKO âgées de 8 mois. L'oxydation de l'ADN spermatique chez les souris DKO n'est donc pas plus forte que chez les souris WT à 4 mois, mais elle augmente par la suite et devient bien plus élevée chez les souris DKO que chez les souris WT à 8 mois.

c. Les protéines antioxydantes

➤ **L'activité enzymatique glutathion peroxydase globale**

Afin d'évaluer l'impact de la perte de snGPx4 et GPx5, l'activité enzymatique glutathion peroxydase globale des tissus de la tête et de la queue de l'épididyme a été mesurée chez les souris WT et DKO de 4 et de 8 mois, en utilisant l'H₂O₂ comme substrat. Dans le but d'avoir un point de comparaison en termes de physiologie et pour vérifier l'absence de variation sur un organe non lié à l'épididyme, l'activité enzymatique a également été mesurée à 4 mois sur les tissus du foie qui est un des organes présentant la plus forte activité glutathion peroxydase à cause de sa fonction

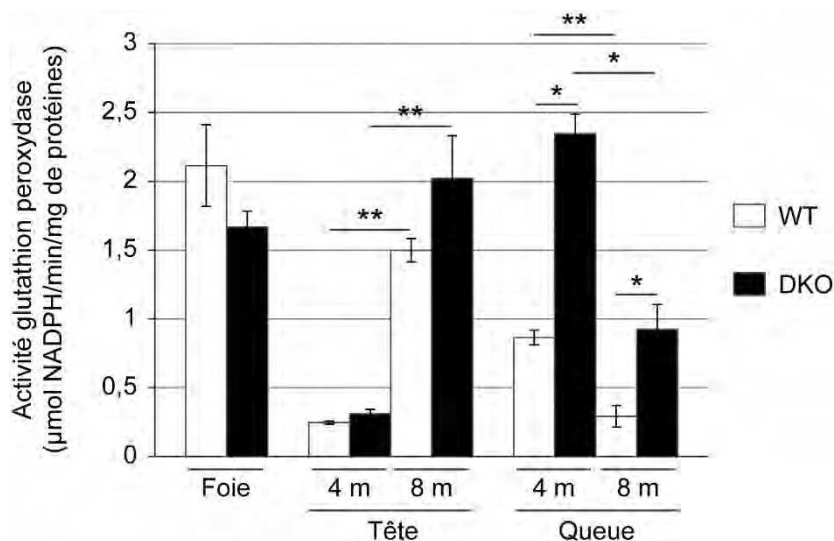


Figure 81 : L'activité enzymatique glutathion peroxydase globale

Les protéines du foie, de la tête et de la queue de l'épididyme sont extraites chez des souris WT et DKO de 4 et 8 mois (m : mois). L'activité glutathion peroxydase des extraits de protéines est dosée en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme substrat. n=5. * : p < 0,05 ; ** ; p < 0,01.

Gène	4 mois				8 mois			
	Tête		Queue		Tête		Queue	
	Statistique	Facteur	Statistique	Facteur	Statistique	Facteur	Statistique	Facteur
<i>gpx1</i>	*	- 1,52	=		*	- 2,62	=	
<i>gpx3</i>			=		=		=	
<i>gpx4</i>	**	- 1,84	p=0,0635	- 2,07	*	- 1,58	=	
<i>catalase</i>	*	- 1,35	=		=		**	+ 2,99
<i>sod3</i>			*	- 3,36	=		=	
<i>prdx1</i>			=		=		=	
<i>prdx2</i>			=		=		=	
<i>prdx3</i>			**	+ 1,79	*	+ 1,35	p=0,0952	+ 1,69
<i>prdx4</i>			=		*	+ 1,4	p=0,0556	+ 1,84
<i>prdx5</i>			=		=		=	
<i>prdx6</i>			=		p=0,0556	- 1,18	=	
<i>txn1</i>			*	+ 1,47	=		=	
<i>txn2</i>			=		p=0,0556	- 1,25	=	
<i>txn1l1</i>	**	+ 1,26	=		=		=	
<i>gst μ</i>	*	+ 1,34	p=0,0556	+ 1,37	=		=	
<i>gst π</i>	*	+ 1,38	p=0,0556	+ 1,36	**	+ 1,45	**	1,92

Tableau 16 : L'expression des gènes codant pour des enzymes antioxydantes

La quantité d'ARNm produit par chaque gène a été déterminée par RT-Q-PCR, de façon relative à la quantité d'ARNm de la cyclophiline B. L'analyse a été réalisée à partir d'extraits d'ARNm de tissus de la tête et de la queue d'épididyme de souris âgées de 4 ou 8 mois (n=5). Les différences significatives d'expression ou celles présentant une forte tendance entre les souris sauvages et DKO sont indiquées par la présence d'un symbole + ou - suivi par le facteur d'augmentation ou de diminution de l'expression, respectivement, chez les souris DKO par rapport aux souris WT. Un signe = indique une différence d'expression non significative. * : p < 0,05 ; ** ; p < 0,01.

détoxifiante sur le sang. L'analyse a été effectuée de façon indirecte en mesurant la vitesse de consommation du NADPH, qui est utilisé par la glutathion réductase pour régénérer le GSH.

Les résultats montrent qu'entre les souris WT et DKO, l'activité enzymatique GPx n'est pas modifiée dans le foie, mais qu'il existe de grandes variations dans l'épididyme (figure 81).

À 4 mois, l'activité GPx dans la tête de l'épididyme ne varie pas entre les deux génotypes et elle est plutôt faible. Cependant, dans la queue de l'épididyme des souris DKO, cette activité est plus que doublée par rapport à celle des souris WT, au point d'atteindre une activité enzymatique GPx aussi forte que celle présente dans le foie.

À 8 mois, l'activité GPx dans la tête de l'épididyme est bien plus forte que celle présente à 4 mois, atteignant une activité équivalente à celle observée dans le foie, mais elle est similaire entre les souris WT et DKO. Dans la queue de l'épididyme, l'activité GPx est toujours nettement supérieure chez les souris DKO par rapport aux souris WT, avec une multiplication par 3 de l'activité enzymatique. Cependant, en la comparant avec celle observée au même endroit à 4 mois, une importante diminution de cette activité peut être notée, ramenant cette activité à celle observée dans la queue de l'épididyme chez les souris WT de 4 mois.

➤ *L'expression génique*

Une analyse de l'expression des gènes codant pour des enzymes antioxydantes a été réalisée par Q-PCR, afin de savoir quels acteurs enzymatiques antioxydants varient chez les souris DKO par rapport aux souris WT et sont à l'origine de ces variations d'activité enzymatique. Cette analyse a été menée sur les tissus de la tête et de la queue de l'épididyme, à 4 et à 8 mois.

Les résultats indiquent que l'expression des transcrits de *sod3* est fortement réduite dans la queue de l'épididyme des souris DKO de 4 mois, avant de revenir à la normale chez les souris plus âgées, à 8 mois (tableau 16). Le gène codant pour la catalase est également moins exprimé chez les souris DKO de 4 mois, mais ce dans la tête de l'épididyme uniquement. C'est seulement dans la queue de l'épididyme des souris DKO de 8 mois que l'expression du gène codant pour la catalase est fortement augmentée par rapport aux souris WT. Contrairement à ce qui avait pu être observé chez les souris *gp5*^{-/-} (Chabory *et al.*, 2009), les autres GPx exprimées dans l'épididyme ne sont pas surexprimées chez les souris DKO. Au contraire, si *gp3* ne voit pas son expression modifiée, *gp1* et *gp4* ont quant à elles une expression bien inférieure à celle observée chez les souris WT, et ce plus particulièrement dans la tête de l'épididyme. Ainsi, la triade antioxydante classique « SOD/GPx/catalase » ne semble pas compenser l'absence de l'activité luminale GPx5 et prendre en charge les excès d'EOR non consommés par la snGPx4. Cette voie canonique antioxydante paraît même être inhibée.

La voie antioxydante « Trx/Prx » est par contre plus sollicitée. À 4 mois, le gène *txn1* est plus exprimé dans la tête des souris DKO que dans celle des souris WT, ce qui peut potentiellement permettre d'augmenter la vitesse de régénération des Prx et donc leur activité enzymatique. Dans la queue de l'épididyme, à 4 mois, une augmentation de l'expression de *txn1* et *prdx3* est observée. À 8 mois, la situation est plus complexe. Dans la tête de l'épididyme, *prdx3* et *prdx4* sont plus exprimés, tandis que l'expression de *prdx6* et *txn1* a tendance à diminuer. Dans la queue de

l'épididyme, seuls les gènes *prdx3* et *prdx4* semblent présenter une tendance à l'augmentation de leur expression.

Enfin, les gènes des glutathion transférases des classes π et μ voient leur expression augmenter dans la tête comme dans la queue de l'épididyme des souris DKO à 4 mois. À 8 mois, cependant, seul *gst μ* voit son expression augmentée, mais cette augmentation est plus forte qu'à 4 mois et plus particulièrement dans la queue de l'épididyme. Les glutathion transférases étant notamment connues pour leur activité contre la peroxydation lipidique (élimination des produits finaux, réduction des lipides hydroperoxydés, régénération de Prx6), l'augmentation de leur expression pourrait expliquer, au moins en partie, la diminution de la peroxydation lipidique observée à 4 mois.

L'ensemble de ces données semblent indiquer que l'épididyme des souris DKO cherche à compenser la perte de GPx5 et snGPx4 par une augmentation de l'expression de certaines enzymes des familles « thiorédoxine », « peroxyrédoxine » et « glutathion transférase », afin de maintenir la protection des tissus épидидymaires et des gamètes. Cette protection est également exacerbée dans la queue de l'épididyme des souris DKO de 8 mois par l'augmentation de l'expression de la catalase, dont l'activation de l'expression sous-entend la présence d'un très fort stress oxydant dû au peroxyde d'hydrogène, étant donné qu'il s'agit du seul substrat de cette enzyme.

L'épididyme des souris DKO répond à l'absence de snGPx4 et GPx5 par une augmentation de l'expression de certaines enzymes antioxydantes, des Trx, des Prx, des GST et la catalase. Cependant, contrairement à ce qu'on aurait pu attendre, les autres GPx synthétisées par l'épididyme ne sont pas surexprimées chez les souris DKO, elles sont même moins exprimées dans le cas de GPx1 et GPx4. Selon l'âge et la région de l'épididyme, les gènes dont l'expression est modifiée ne sont pas les mêmes. En termes d'activité enzymatique peroxydase, une forte augmentation a été observée dans la queue de l'épididyme des souris DKO par rapport aux souris WT. Néanmoins, ce sursaut d'activité disparaît entre 4 et 8 mois. Ceci pourrait expliquer pourquoi, chez les souris DKO, la présence de bases oxydées dans l'ADN spermatique n'augmente pas à 4 mois, mais seulement à 8 mois lorsque le niveau de protection antioxydante retombe. Ce sursaut d'activité antioxydante palliant l'absence de GPx5 et snGPx4 est aussi illustré par les mesures de la concentration des produits finaux de la peroxydation lipidique qui indiquent que les membranes des tissus et des spermatozoïdes épидидymaires sont mieux protégées de l'oxydation chez les souris DKO que chez les souris WT. L'ensemble de ces données semblent indiquer que l'épididyme des souris DKO réussit à se protéger lui-même ainsi que les gamètes d'une augmentation du stress oxydant. Cependant, si cette tentative de compensation de l'absence de GPx5 et snGPx4 est particulièrement efficace dans la protection des membranes, elle reste relativement inopérante dans la protection de l'intégrité de l'ADN spermatique, puisque celui-ci est plus fragmenté dès 4 mois et plus oxydé à partir de 8 mois.

6. La fonction de reproduction des mâles *sngpx4;gpx5*^{-/-}

Étant donnés les défauts relevés dans la structure de la chromatine et la perte d'intégrité de l'ADN spermatique chez les souris DKO, la fonction de reproduction des souris mâles DKO a été

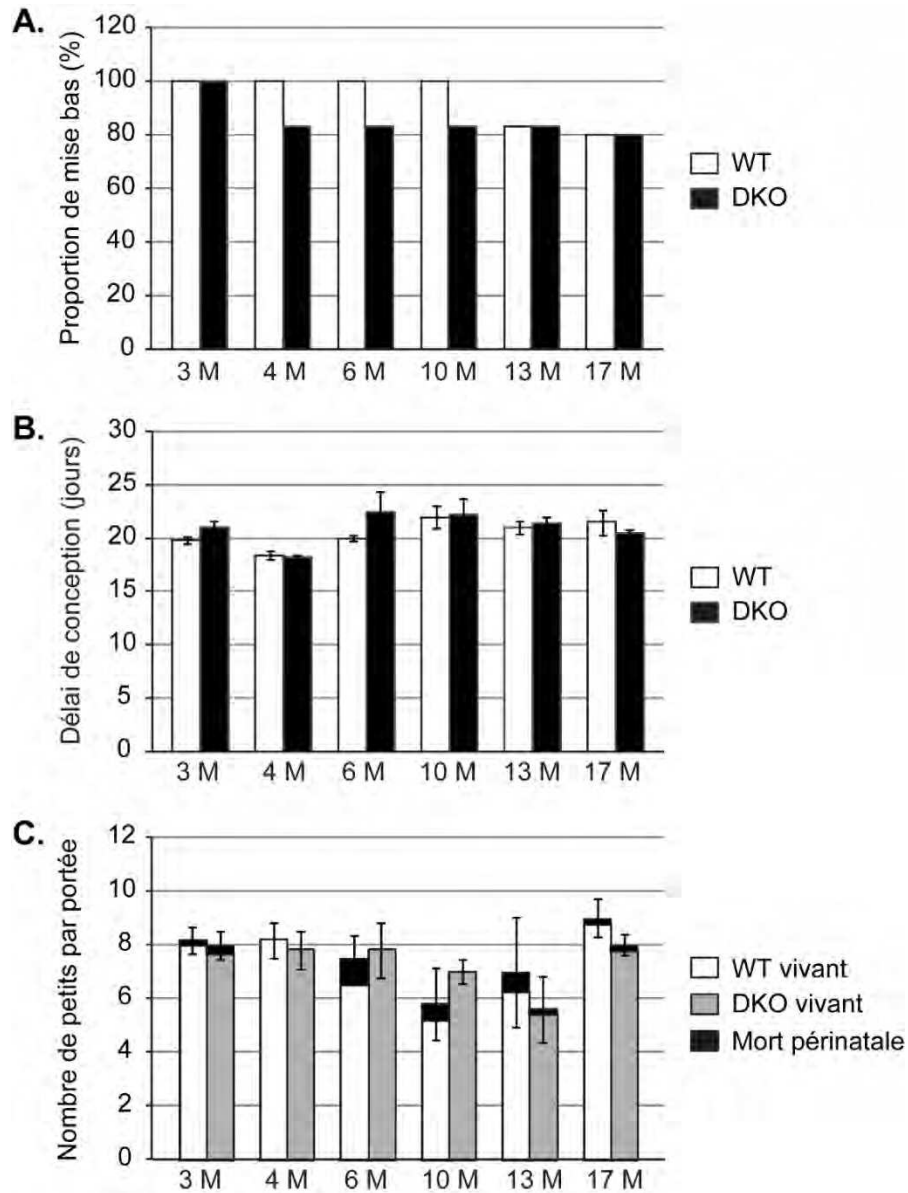


Figure 82 : La fertilité des souris

Des souris mâles WT et DKO ont été mis en croisement à plusieurs reprises avec des souris femelles WT de 4 mois. La proportion de mises bas (A), le délai de conception (B), la taille des portées (C) et le nombre de morts périnatales (C) ont été mesurés. Les résultats sont présentés en fonction de l'âge des mâles à chaque croisement (M : mois). n=5.

évaluée par la réalisation de croisement de ces mâles à différents âges (de 3 à 17 mois), avec des souris femelles WT de même fond génétique de 4 mois dont le cycle sexuel a été synchronisé.

Aucun des paramètres étudiés lors de ces tests de fertilité (proportion de mises bas, délai de conception, taille des portées, mortalité périnatale) ne varie chez les mâles DKO par rapport aux mâles WT et ceci quel que soit leur âge (figure 82). Ainsi la protection des gamètes, bien qu'imparfaite, semble suffisante pour assurer une fertilité normale à ces souris mâles DKO dans des conditions naturelles de reproduction (monte naturelle).

II. L'étude de la localisation des dommages oxydants au sein de l'ADN spermatique de souris

Les spermatozoïdes des souris *gpx5*^{-/-} (Chabory *et al.*, 2009) et *sngpx4;gpx5*^{-/-} (présentées ici) présentent des dommages oxydants sur leur ADN. Ces dommages dans les deux cas sont associés à des modifications de la condensation de la chromatine spermatique. Cependant, seuls les souris mâles *gpx5*^{-/-} possèdent une fertilité diminuée, associée à ces dommages sur les gamètes. Afin de déterminer par quel moyen ces dommages sur l'ADN spermatique altèrent la fonction de reproduction des souris, la localisation des dommages oxydants par rapport à la structure de la chromatine (protamines, histones...) et aux régions chromosomiques a été analysée de façon plus fine dans le fond génétique *gpx5*^{-/-}.

1. L'organisation de la chromatine spermatique épидидymaire de souris et la localisation des dommages oxydants

a. La distribution spatiale des différentes protéines nucléaires basiques spermatiques murines

Avant de pouvoir analyser la localisation des dommages oxydants sur l'ADN spermatique, il a tout d'abord été nécessaire de comprendre comment cet ADN est organisé à l'intérieur du noyau des spermatozoïdes de souris. L'ADN spermatique chez les mammifères est agencé d'une façon tout à fait particulière, qui diffère de l'organisation classique d'un noyau d'une cellule somatique. En effet, lors de la spermatogénèse, les histones canoniques composant les nucléosomes ont tout d'abord été en partie remplacées par des variants d'histones, puis les nucléosomes d'histones canoniques et de variants ont été presque entièrement retirés et remplacés par des protamines (Prm). Ainsi, à la fin de la spermatogénèse, l'ADN spermatique murin est principalement associé aux protamines Prm1 et Prm2. Seule une petite part de l'ADN spermatique reste liée à des nucléosomes, contenant à la fois des histones canoniques et des variants d'histones spécifiques ou non des spermatozoïdes.

Certains travaux de recherche ont suggérés que les nucléosomes persistants ne seraient pas localisés de façon aléatoire le long de la séquence d'ADN (Arpanahi *et al.*, 2009 ; Hammoud *et al.*, 2009, 2011), ainsi que dans le volume du noyau (Li *et al.*, 2008). Il a aussi été proposé que la structure de la chromatine spermatique et donc la localisation des nucléosomes soit probablement dépendante de l'espèce étudiée.

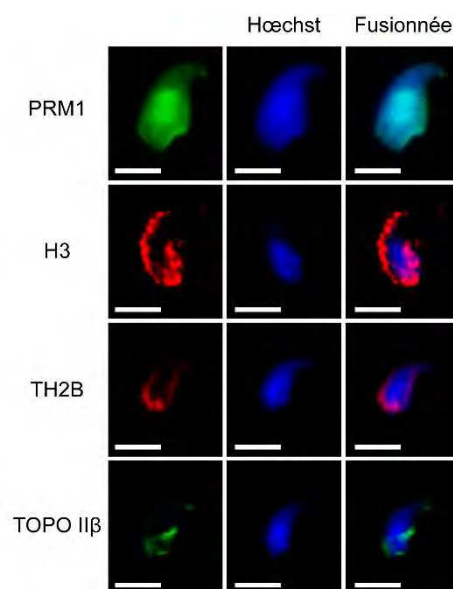


Figure 83 : La localisation des protéines nucléaires spermatiques

Des spermatozoïdes de souris WT ont été soumis à différentes détections immunofluorescentes afin de localiser la protamine 1 (Prm1), l'histone canonique H3, le variant H2B spécifique du testicule (TH2B) et la topoisomérase IIβ (TOPO IIβ), marqueur des MAR. Les résultats ont été analysés par microscopie confocale. Échelle : 10 μm.

Pour évaluer l'organisation du noyau spermatique murin, la localisation de différentes protéines nucléaires a été analysée au sein des spermatozoïdes de la queue d'épididyme des souris WT par une approche immunologique. Un immunomarquage fluorescent, observé par microscopie confocale, a été réalisé sur des spermatozoïdes à l'ADN préalablement décondensé de façon partielle, à l'aide d'anticorps dirigés contre :

- La protamine Prm1 ;
- L'histone H3, qui est une des histones canoniques ;
- L'histone TH2B, qui est un variant de H2B spécifique du testicule ;
- La protéine TOPO II β , qui possède une activité endonucléase et qui est spécifiquement localisée au niveau des séquences de liaison à la matrice nucléaire (MAR).

Un contrôle négatif a été réalisé pour chaque marquage en réalisant le protocole sans utiliser l'anticorps primaire. Pour les 4 immunomarcages, aucun marquage aspécifique par l'anticorps secondaire n'a été observé (données non montrées).

La protéine nucléaire basique Prm1 est distribuée sur la totalité de l'espace du noyau, de façon homogène dans tous les noyaux spermatiques, ce qui n'est pas le cas des différentes histones (figure 83). En effet, l'histone H3 et le variant TH2B sont tous les deux localisés exclusivement sur la périphérie du noyau des spermatozoïdes, avec parfois un marquage très accentué à la base du noyau, c'est-à-dire dans la région dite de l'*annulus* nucléaire. Cependant, le marquage de H3 est de type ponctiforme avec certaines zones localisées de marquage très intense, tandis que le marquage de TH2B présente un aspect plus homogène sur toute la périphérie du noyau.

La protéine TOPO II β , qui est un marqueur des MAR où l'ADN est associé à la matrice nucléaire, est située également à la périphérie du noyau spermatique et en particulier sur une large région située à la base du noyau (figure 83) et correspondant probablement à la région où l'ADN est lié à l'*annulus* nucléaire (figure 34). Le marquage est relativement homogène, bien que des zones d'intensité plus forte soient souvent visibles à la base du noyau.

b. La localisation spatiale des dommages oxydants dans les spermatozoïdes murins

Les dommages oxydants ont été analysés par la même technique employée que celle ayant permis de localiser les différentes protéines nucléaires spermatiques. L'anticorps employé se fixe spécifiquement aux bases 8-OHdG. L'immunomarquage est réalisé sur des spermatozoïdes de queue d'épididyme de souris WT et *gpx5*^{-/-}, ainsi que sur des spermatozoïdes de souris WT, traités pendant 2 heures avec 7 mM d'H₂O₂. Un contrôle négatif du marquage a été réalisé sans anticorps primaire. L'observation de ce contrôle négatif a révélé qu'il n'y a pas de fixation aspécifique de l'anticorps secondaire couplé à la sonde fluorescente. Ceci est confirmé par le fait qu'une partie des spermatozoïdes issus des souris WT et *gpx5*^{-/-} ne présentent absolument aucun marquage par l'anticorps anti-8-OHdG, comme illustré sur les photographies correspondant au spermatozoïde de souris WT sur la figure 84A.

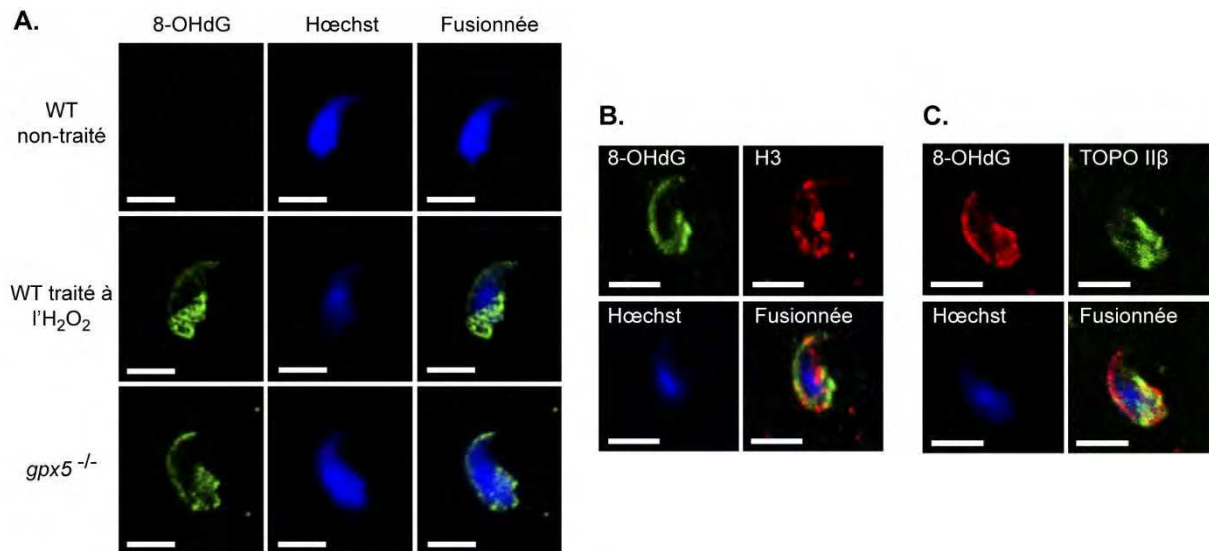


Figure 84 : La localisation des dommages oxydants dans le noyau spermatique

Des spermatozoïdes de souris WT et *gpx5*^{-/-} ont été soumis à une détection immunofluorescente afin de localiser l'ADN oxydé *in vivo*, de même que des spermatozoïdes WT soumis à une incubation en H₂O₂ pour localiser les dommages oxydants subis *in vitro* (A). Un double marquage du 8-OHdG et de l'histone H3 (B) ou de la TOPO IIβ (C) a été réalisé. Les résultats ont été analysés par microscopie confocale. Échelle : 10 μm.

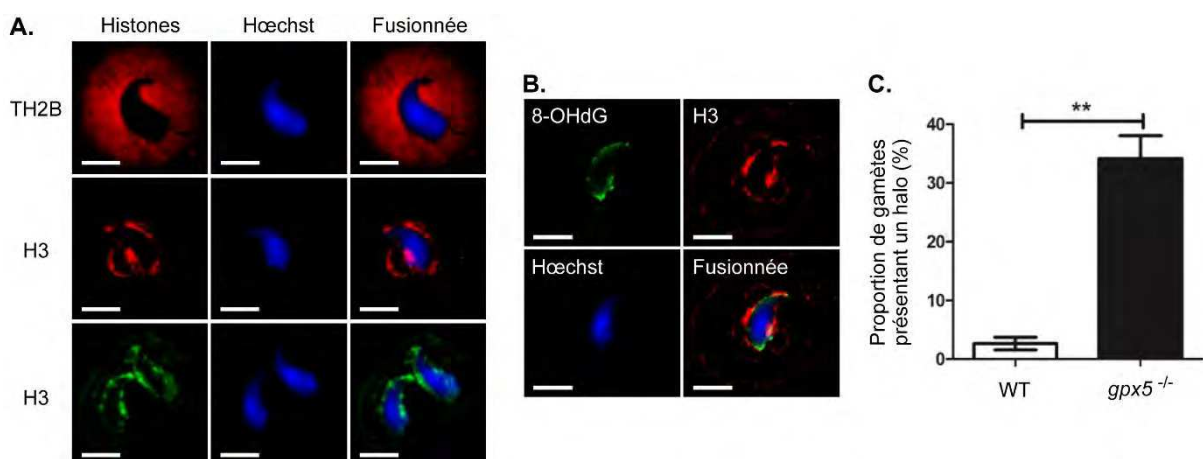


Figure 85 : Les effets de l'oxydation sur l'ADN

L'immunomarquage fluorescent des histones H3 et TH2B, observé par microscopie confocale, montre la présence de halos suite à la décondensation de l'ADN spermatique (A). Le co-marquage du 8-OHdG et de l'histone H3 sur un spermatozoïde présentant un halo d'ADN montre que la localisation des dommages oxydants reste intranucléaire (B). Le nombre de halos visibles grâce à l'immunomarquage de TH2B a été compté chez les souris WT et *gpx5*^{-/-} (C). n=5. ** ; p < 0,01.

Les spermatozoïdes non traités issus des souris WT ne présentent pas tous une absence de marquage. Comme chez les spermatozoïdes issus des souris *gpx5*^{-/-}, plusieurs d'entre eux montrent un marquage plus ou moins intense situé en périphérie du noyau. Ce marquage est généralement de type ponctiforme et est particulièrement intense dans une large région basale du noyau et dans la région subacrosomique. Il est identique au marquage observé sur les spermatozoïdes traités avec de l'H₂O₂ et issus de souris WT, qui servent de contrôle positif du marquage.

Pour avoir une meilleure idée de la localisation du 8-OHdG par rapport aux différentes protéines nucléaires spermatiques, des co-marquages du 8-OHdG et de l'une ou l'autre de ces protéines ont été réalisés. Ces co-marquages indiquent que les profils de marquage des histones H3 (figure 84B) et de la TOPO IIβ (figure 84C) sont très proches de celui du 8-OHdG et qu'ils sont au moins partiellement co-localisés. Ainsi, les dommages oxydants semblent principalement localisés dans des régions du noyau spermatique qui contiennent l'ADN lié à des histones et qui sont également situées proches des MAR.

Lors du marquage des histones H3 et TH2B, des spermatozoïdes présentant un halo autour du noyau ont pu être observés. Ce type de halo a déjà été décrit lors d'une décondensation importante de l'ADN spermatique et mis en évidence par un marquage au bromure d'éthidium (travaux de l'équipe du Dr. S. Ward, Hawaii, USA). Ce halo est généré par la sortie du noyau de boucles d'ADN de tailles variées. Durant le marquage des histones, ce halo peut se présenter de différentes façons. Il peut s'agir d'un marquage des histones sur l'ensemble de la surface occupée par les boucles (figure 85A, marquage de TH2B) ou d'un marquage uniquement localisé à l'extrémité des boucles d'ADN sortant de la membrane nucléaire (figure 85A-B, marquage de H3). Le marquage des histones canoniques et des variants peut alors également être uniquement localisé à l'extérieur des membranes nucléaires (figure 85A, marquage de TH2B) ou être à la fois à l'extérieur et à la périphérie du noyau (figure 85A-B, marquage de H3). Cette dernière différence est peut être due à l'intensité de la décondensation de la chromatine, qui est variable d'un spermatozoïde à l'autre, selon leur sensibilité au tampon de décondensation.

Le comptage des événements de « halos » observés lors d'un marquage du variant TH2B montrent qu'ils sont beaucoup plus fréquents chez les souris *gpx5*^{-/-} (figure 85C). Ces résultats indiquent une plus grande sensibilité des spermatozoïdes des souris *gpx5*^{-/-} aux conditions réductrices, comme cela avait pu être observé chez les souris DKO. Ceci suggère que l'oxydation des noyaux des spermatozoïdes est à l'origine de leur sensibilité à des conditions réductrices.

De plus, il est important de noter que le co-marquage de l'histone H3 et du 8-OHdG montre qu'en présence d'un halo le marquage du 8-OHdG reste exclusivement et systématiquement situé à l'intérieur des membranes nucléaires, quelle que soit l'étendue du halo, et n'est donc pas présent sur les boucles à l'extérieur du noyau spermatique.

Ces derniers résultats ont été confirmés par une approche biochimique par fractionnement de la chromatine spermatique (figure 86). Brièvement, les noyaux des spermatozoïdes sont isolés puis soumis à une décondensation de la chromatine en présence de DTT et de Triton X-100. Cette décondensation provoque la formation de halos de boucle d'ADN autour des noyaux. Un clivage des boucles est réalisé à l'aide de l'enzyme MNase. Les boucles d'ADN se solubilisent dans le tampon de digestion, tandis que l'ADN toujours contenu dans les membranes nucléaires ne le peut

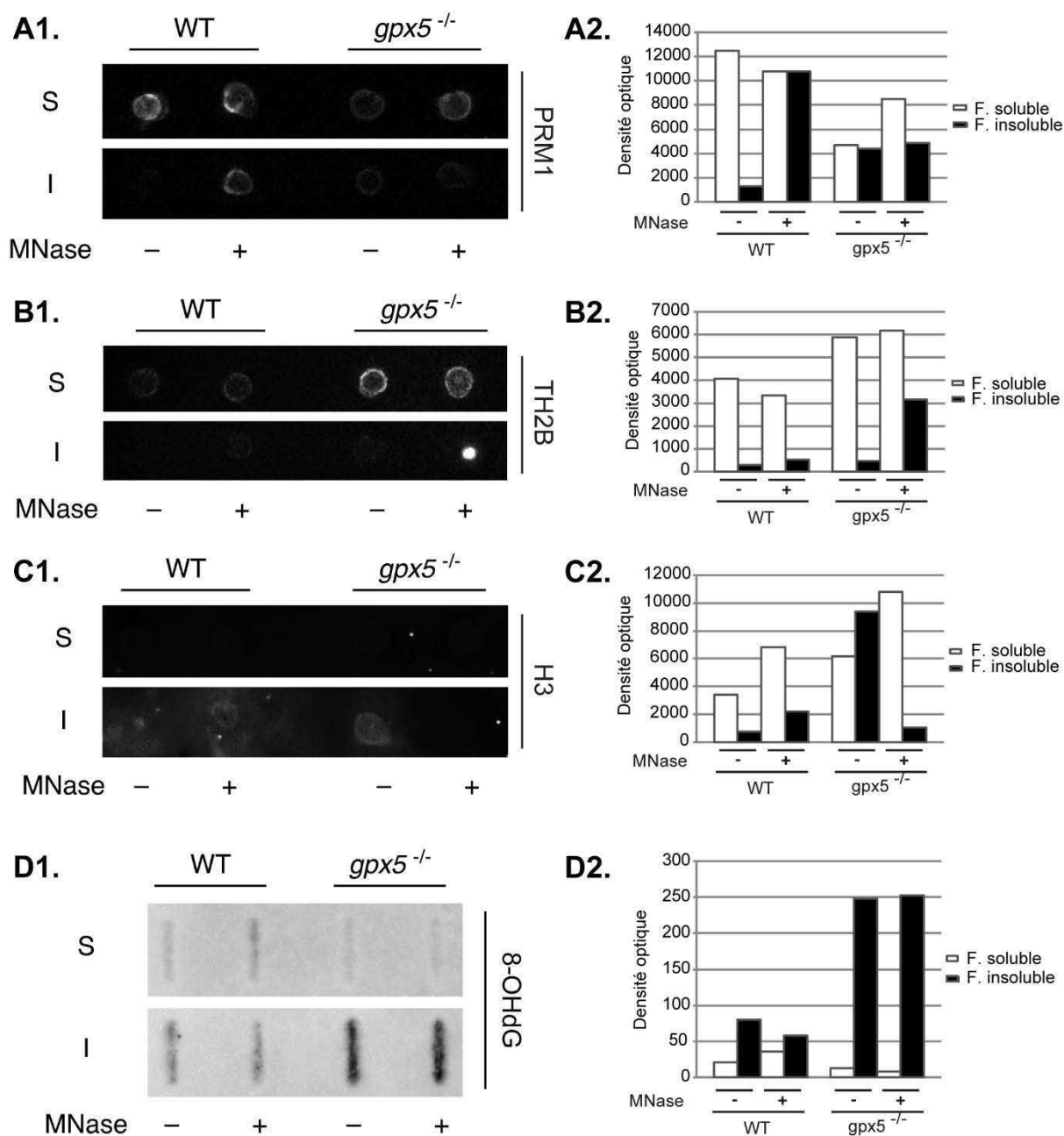


Figure 86 : L'analyse biochimique de la localisation des dommages oxydants par rapport à l'organisation de la chromatine spermatique

Le fractionnement de la chromatine des spermatozoïdes a été réalisé en clivant les boucles d'ADN obtenues lors de la décondensation de l'ADN. La fraction soluble (S) de la chromatine correspond aux boucles d'ADN sorties du noyau, tandis que la fraction insoluble (I) comprend l'ADN resté à l'intérieur du noyau. Une immunodétection de différentes nucléoprotéines (A1, Prm1 ; B1, TH2B ; C1 : H3) a été réalisée sur chaque fraction de chromatine. L'ADN de chaque fraction a été extrait et purifié, puis déposé en quantité égale sur une membrane avant de subir une immunodétection de la guanine oxydée (D1 : 8-OHdG). Le signal de chaque dot/slot blot est quantifié et présenté sur un histogramme (2).

pas. Ainsi, les boucles d'ADN, formant la fraction soluble, sont séparées de l'ADN resté dans le noyau, insoluble, par centrifugation.

L'analyse des protéines nucléaires contenues dans les deux fractions d'ADN indique que Prm1 est présente à la fois dans les boucles et à l'intérieur du noyau (figure 86A) et que TH2B, bien que partiellement contenue dans le noyau, semble majoritairement présente dans les boucles à l'extérieur de l'ADN (figure 86B). Concernant H3, elle semble présente dans les deux fractions (figure 86C). Ces résultats sont en accord avec l'observation des profils de marquage des histones au niveau des spermatozoïdes présentant un halo d'ADN (figure 85A-B). Par ailleurs, l'analyse indique que des boucles d'ADN sont également libérées en absence de MNase, lors de l'étape de digestion. Ce résultat peut être expliqué par la présence et l'activation d'une endonucléase endogène au noyau spermatique durant l'ajout du CaCl_2 . La présence d'une telle enzyme endonucléase a déjà été mise en évidence dans le noyau des spermatozoïdes de hamster, de souris et de l'homme (Sotolongo *et al.*, 2003, 2005).

L'ADN contenu dans chaque fraction a ensuite été extrait et purifié avant d'être analysé par slot blot afin de détecter la présence de 8-OHdG. Les résultats montrent que, à quantité égale d'ADN déposé, la concentration en 8-OHdG est plus importante dans l'ADN resté prisonnier des membranes nucléaires que dans les boucles d'ADN du halo, chez les spermatozoïdes de souris WT comme de souris $gpx5^{-/-}$ (figure 86D). La seule différence observable entre les spermatozoïdes des deux différents génotypes vient du fait que la concentration en 8-OHdG est environ 5 fois plus forte dans l'ADN des spermatozoïdes des souris $gpx5^{-/-}$ que dans celui des spermatozoïdes des souris WT, ce qui confirme à nouveau la présence d'un stress oxydant chez les souris $gpx5^{-/-}$ (Chabory, 2009 ; Chabory *et al.*, 2009).

2. La localisation chromosomique des dommages oxydants

Après avoir analysé la localisation des dommages oxydants en fonction de la structure de la chromatine spermatique, une approche globale permettant de déterminer quelles régions du génome sont plus sensibles à l'oxydation a été mise en place. Il s'agit de réaliser une immunoprécipitation de l'ADN oxydé à partir d'ADN spermatique murin purifié et fragmenté, suivie d'un séquençage à haut débit des fragments d'ADN oxydés précipités. Cette immunoprécipitation a été conduite sur les souris WT, $gpx5^{-/-}$ et DKO.

Le protocole utilisé a été mis au point à partir d'un protocole d'immunoprécipitation de l'ADN méthylé (meDIP). La différence vient du fait que l'anticorps employé est dirigé non pas contre le 5-méthylcytosine (5-meC) mais contre les bases 8-OHdG. De façon à s'assurer de l'efficacité du protocole et de la fiabilité du matériel (billes magnétiques couplées à des protéines chimériques A/G, kit d'éluion et purification de l'ADN...), l'immunoprécipitation a été réalisée en parallèle avec l'anticorps anti-8-OHdG et un anticorps anti-5-meC dont le clone est connu pour son efficacité lors de protocoles de meDIP. En guise de contrôle négatif, l'immunoprécipitation a également été réalisée en présence d'un isotype contrôle aspécifique, ainsi qu'en absence d'anticorps.

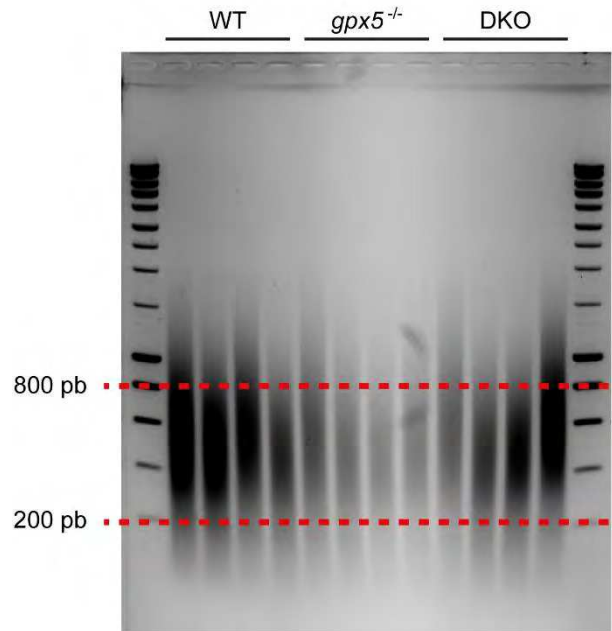


Figure 87 : Le contrôle de l'efficacité de la sonication et de la taille des fragments d'ADN

L'ADN spermatique extrait est purifié et soniqué afin de le fragmenter. La taille des fragments d'ADN est analysée par électrophorèse, en présence de bromure d'éthidium.

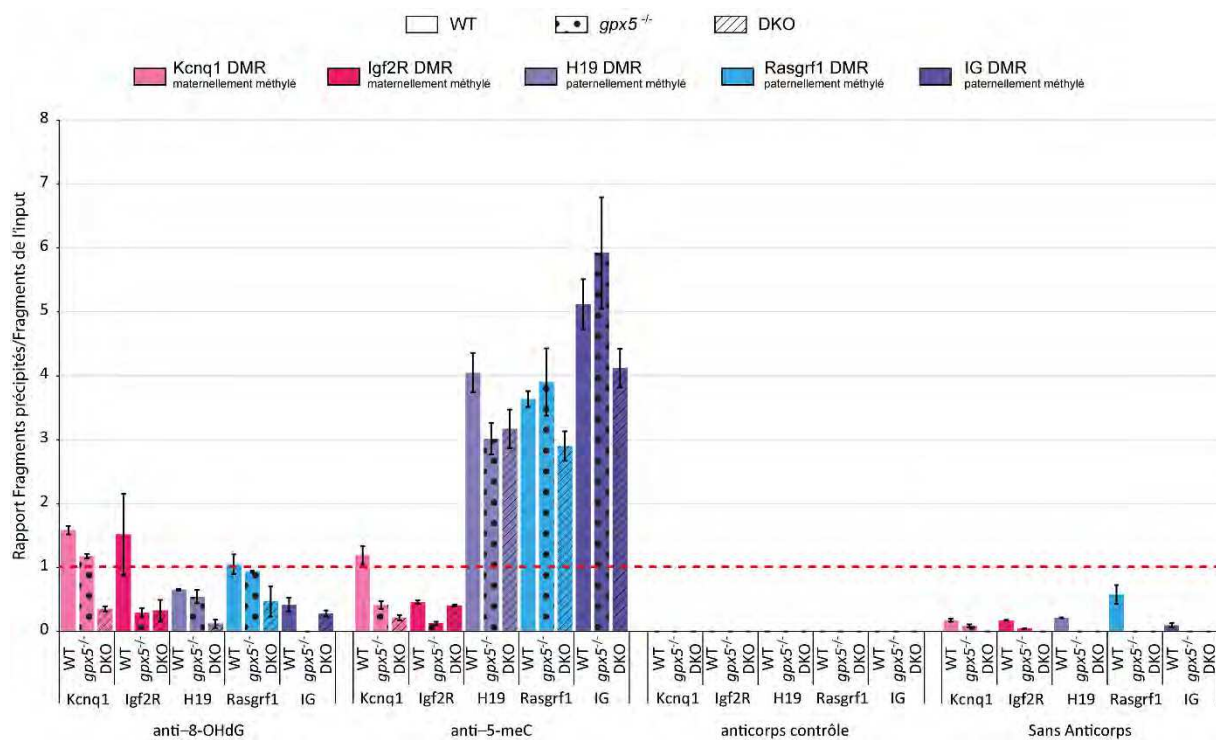


Figure 88 : Le contrôle de l'efficacité de l'immunoprécipitation

Le protocole d'immunoprécipitation de l'ADN spermatique a été réalisé avec un anticorps dirigé contre le 8-OHdG, mais également avec un anticorps anti-5-méthylcytosine, connu pour son efficacité dans ce type de protocole. La vérification de la validité du protocole a été effectuée en réalisant des PCR sur les échantillons d'ADN précipités, afin de vérifier l'enrichissement en ADN méthylé, suite à l'utilisation de l'anticorps anti-5-mC. La quantité des séquences d'ADN cibles dans les échantillons précipités est rapportée à celle dans l'ADN de départ (*input*). Un rapport inférieur à 1 indique une déplétion en cette séquence cible, tandis qu'un rapport supérieur à 1 indique un enrichissement.

Après l'extraction et la purification de l'ADN spermatique murin provenant de souris WT, *gpx5*^{-/-} et DKO, une sonication permet de fragmenter les brins d'ADN. La taille moyenne des fragments est analysée par une électrophorèse en gel d'agarose. Lors de la réalisation finale du protocole, la taille des fragments obtenus était comprise entre 800 et 300 pb, avec une majeure partie des fragments mesurant environ 500 pb (figure 87). Cette analyse des fragments a également permis de s'assurer de l'absence d'ARN dans les échantillons d'ADN, suite au traitement par la RNase A.

Après la réalisation de l'immunoprécipitation et la purification de l'ADN oxydé, les fragments d'ADN obtenus ont été amplifiés, clonés puis séquencés par la technique du « *paired-end sequencing* » par le laboratoire du Pr. Stephen A. Krawetz (Wayne State University, School of Medicine, Detroit, USA). L'analyse des résultats du séquençage est actuellement en cours.

Les fragments obtenus ont également été analysés par PCR afin de déterminer si le protocole d'immunoprécipitation a été efficace. Pour cela, ne connaissant pas les régions oxydées du génome, c'est l'enrichissement en séquences méthylées par l'anticorps anti-5-meC qui a été vérifié. Des PCR ont été réalisées en utilisant des amorces permettant d'amplifier les séquences différenciellement méthylées entre les génomes d'origine paternelle et maternelle (DMR), qui sont connues pour réguler certains gènes dits « soumis à l'empreinte parentale ». Ayant effectué l'immunoprécipitation sur de l'ADN spermatique, seuls les fragments d'ADN correspondant aux DMR paternellement méthylées doivent avoir été enrichis dans l'ADN précipité par l'anticorps anti-5-meC par rapport à l'ADN total de départ (*input*).

Les résultats de ces PCR indiquent que les séquences des DMR ne sont pas détectables dans les échantillons précipités avec l'anticorps aspécifique et que, sans anticorps, ces séquences sont très peu précipitées (figure 88). Ceci signifie que les billes servant à précipiter le couple anticorps/ADN ne peuvent fixer que très peu d'ADN de façon aspécifique et qu'elles n'en fixent pas du tout si elles sont couvertes d'anticorps. L'ADN précipité avec l'anticorps anti-5-meC présente un fort enrichissement en séquences DMR paternellement méthylées (*loci* H19, Rasgrf1 et IG) par rapport à l'ADN de l'*input* et un appauvrissement en séquences DMR maternellement méthylées (*loci* Kcnq1 et Igf2R) (figure 88). Le fait que des séquences DMR maternellement méthylées soient détectables dans l'ADN spermatique précipité par meDIP peut être dû à la présence de spermatozoïdes présentant des défauts dans leur profil de méthylation ou/et à une légère contamination par des cellules immunitaires ou épидидymaires. Concernant l'ADN précipité par l'anticorps anti-8-OHdG, la plupart des échantillons obtenus sont appauvris en séquences DMR, bien que les DMR de Kcnq1 et Rsgrf1 soient présentes dans les mêmes proportions que dans l'ADN de l'*input* dans les échantillons WT et *gpx5*^{-/-} (figure 88), ce qui pourrait indiquer que ces séquences sont sujettes à l'oxydation dans les spermatozoïdes.

L'analyse de la localisation des dommages oxydant sur l'ADN spermatique a permis de montrer que ces dommages ne sont pas localisés de façon aléatoire. D'un point de vue spatial, les bases 8-OHdG sont retrouvées dans la périphérie du noyau spermatique et surtout dans une large région située à la base du noyau. Ces régions correspondent à celles enrichies en nucléosomes, qu'ils soient composés d'histones canoniques ou de variants, et correspondent également à la localisation de TOPO II β qui est un marqueur des MAR. Les spermatozoïdes oxydés ont une plus forte tendance à former des halos de boucles d'ADN sortant des membranes nucléaires lorsqu'ils sont soumis à un milieu réducteur et, dans ces noyaux formant un halo d'ADN, l'ADN ayant été oxydé reste piégé à l'intérieur des membranes nucléaires, suggérant ainsi que les régions d'ADN liées aux histones et associées à la matrice nucléaires sont préférentiellement concernées par l'oxydation.

III. L'étude de l'efficacité d'une supplémentation orale antioxydante sur l'infertilité des souris *gpx5*^{-/-}

[Cette partie du manuscrit est censurée pour des raisons de confidentialité.]

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Les spermatozoïdes sont des cellules très différenciées, dont la fonction principale est d'apporter la copie paternelle du génome du nouvel individu créé lors de la fécondation. Elles sont produites lors de la spermatogénèse dans l'épithélium séminifère des testicules. À leur sortie des testicules, les gamètes mâles possèdent un flagelle leur permettant de remonter les voies génitales femelles jusqu'à l'ovocyte, ainsi qu'une tête contenant un noyau haploïde dont l'ADN est condensé et un acrosome qui renferme des enzymes nécessaires à la traversée de la zone pellucide lors de la fécondation. Cependant, les spermatozoïdes ne sont pas matures et vont devoir progressivement subir un grand nombre de modifications, en particulier à l'échelle moléculaire, pour acquérir leur mobilité et leur capacité fécondante. Ces modifications sont réalisées par différents acteurs présents dans leur environnement, à la fois dans l'épididyme et dans le tractus génital femelle. Dans l'épididyme, cet environnement est le fluide épидидymaire et sa composition est contrôlée par les sécrétions et réabsorptions effectuées par les cellules composant la paroi du tubule épидидymaire. Certains des composants du fluide épидидymaire sont également chargés de protéger les spermatozoïdes, qui ne peuvent pas le faire eux-mêmes à cause de leur absence d'activité transcriptionnelle et traductionnelle et du manque d'enzymes dû à leur cytoplasme réduit à son minimum lors de la spermiogénèse. Cette protection concerne la membrane et le cytosquelette des gamètes afin qu'ils puissent conserver leur mobilité et leur capacité fécondante, mais aussi la chromatine spermatique afin de garantir l'intégrité du patrimoine génétique paternel transmis lors de la fécondation.

Un des moyens mis en œuvre pour protéger le patrimoine génétique paternel est d'accroître le niveau de compaction du noyau spermatique pendant la descente épидидymaire. Ceci est réalisé par pontage disulfure entre les groupements thiols présents sur les résidus Cys des protamines nucléaires. Un environnement pro-oxydant est donc nécessaire pour la réalisation ces événements de pontage, alors que le spermatozoïde craint plus que toute autre cellule l'attaque radicalaire. Un savant équilibre est donc nécessaire dans le contrôle du niveau d'EOR présentes dans le fluide épидидymaire, afin d'assurer à la fois une oxydation physiologique, gage d'une maturation spermatique optimale, et une protection vis-à-vis du stress oxydant, susceptible d'altérer les fonctions du gamète et le noyau paternel. Cet équilibre est maintenu par un ensemble de molécules enzymatiques ou non capables d'éliminer les EOR produites naturellement par le métabolisme aérobie des cellules.

Les travaux que j'ai réalisés lors de ce doctorat ont consisté à étudier la façon dont l'épididyme maintient cet équilibre entre conditions réductrices (déficit en EOR) et conditions oxydantes (excès d'EOR), les dommages occasionnés à l'ADN spermatique en cas de stress oxydant, ainsi que la possibilité de rétablir l'équilibre par l'utilisation d'une supplémentation orale antioxydante dans le cadre d'une infertilité masculine due à un stress oxydant.

I. Les rôles de snGPx4 et GPx5 lors de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes

Afin d'étudier la façon dont l'épididyme parvient à concilier la nécessité d'utiliser des EOR et celle d'en limiter la présence lors de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes, un modèle de souris dites « *double knock-out* » (DKO) ne produisant ni l'enzyme snGPx4, ni l'enzyme GPx5 a

été généré par croisement de souris *gpx5*^{-/-} (Chabory, 2009 ; Chabory *et al.*, 2009) et de souris *sngp4*^{-/-} (Conrad *et al.*, 2005). snGPx4 est l'isoforme nucléaire de GPx4. Elle n'est exprimée que dans le noyau des spermatides en élongation, lors de la spermiogenèse, puis elle reste en place dans les spermatozoïdes où, grâce à son activité de pontage disulfure, elle participe à la poursuite de la compaction de la chromatine épидидymaire et à son verrouillage dans un état condensé. Les isoformes cytosolique et mitochondriale de GPx4 sont toujours activement produites par l'allèle invalidé chez les souris *gpx4*^{-/-} et DKO. GPx5 est une enzyme à activité peroxydase, capable d'éliminer les hydroperoxydes dont l'H₂O₂. Elle est presque exclusivement exprimée par l'épithélium de la tête de l'épididyme, qui la sécrète ensuite dans le fluide, au contact direct des spermatozoïdes avec la membrane desquels une petite fraction de la GPx5 sécrétée peut s'associer (Vernet *et al.*, 1997). La spécificité tissulaire de l'expression de ces deux enzymes a permis de réaliser une invalidation totale des deux gènes, sans risque important de voir apparaître un phénotype majeur en dehors de la sphère génitale masculine chez les souris.

La perte de snGPx4 et GPx5 ne provoque aucune modification de la morphologie des tissus testiculaires et épидидymaires. Le nombre de spermatozoïdes transitant dans les différentes parties de l'épididyme n'étant pas modifié non plus, la spermatogenèse ne semble pas affectée chez les souris DKO. L'absence de mise en place de snGPx4 lors de la fin de la spermiogenèse ne semble donc pas générer d'apoptose ou de rétention des cellules germinales dans l'épithélium séminifère. Seule une augmentation du nombre de gamètes présentant une angulation de la pièce intermédiaire du flagelle a pu être rapportée dans la queue de l'épididyme des animaux DKO.

L'analyse des spermatozoïdes des souris DKO a révélé un défaut de condensation de la chromatine spermatique. Cependant, ce problème n'apparaît que dans certaines conditions particulières. En effet, l'utilisation de la chromomycine A3 (CMA3) comme intercalant de l'ADN sur une suspension de spermatozoïdes analysée par cytométrie en flux ne montre aucune variation de la condensation de la chromatine spermatique entre les souris WT et DKO. Seule la poursuite de la condensation de la chromatine au cours du transit épидидymaire a pu être mise en évidence par cette méthode. Ces résultats semblent également confirmés par l'observation de la chromatine spermatique chez les souris DKO par microscopie électronique à transmission (MET), puisque celle-ci présente toujours une structure extrêmement dense aux électrons, sans augmentation de la taille ou du nombre de lacunes par rapport aux spermatozoïdes des souris WT. Contrairement à ces premières observations, la réalisation d'une coloration des gamètes au bleu de toluidine sur un frotti séché démontre une augmentation importante du nombre de spermatozoïdes issus de la tête d'épididyme dont le noyau est fortement coloré chez les souris DKO par rapport aux souris WT. Ces résultats indiquent une diminution de la condensation de la chromatine des spermatozoïdes de la tête de l'épididyme, qui n'est pas visible avec la CMA3 en cytométrie en flux et par MET, mais qui est confirmée par l'observation de spermatozoïdes présentant une tête géante après une coloration de Shorr. Ces spermatozoïdes à tête géante représentent environ un quart des gamètes issus de la tête de l'épididyme des souris DKO. Ils ne sont pas présents chez les souris WT et ne sont pas visibles par microscopie électronique à balayage (MEB). Ce phénotype avait déjà été rapporté auparavant dans les mêmes proportions chez les souris *sngp4*^{-/-} (Conrad *et al.*, 2005) et il est dû à une augmentation du volume du noyau et non de celui de l'acrosome ou du cytoplasme. Il est donc lié à l'absence de snGPx4 dans le noyau spermatique et ne semble pas aggravé par l'absence de GPx5 dans le fluide épидидymaire. Le fait que cette augmentation de volume du noyau et cette

diminution de la condensation de la chromatine spermatique apparaissent uniquement lors de l'analyse de spermatozoïdes séchés sur lame (bleu de toluidine, Shorr) et pas lors du marquage par la CMA3 et par observation en MEB et en MET, indique que le défaut de condensation de la chromatine n'est révélé qu'en présence d'un stress hydrique des gamètes issus de la tête de l'épididyme. Ce même stress hydrique n'a cependant aucun effet sur les spermatozoïdes issus de la queue de l'épididyme des souris DKO. En effet, les gamètes DKO de la queue de l'épididyme soumis à une coloration de Shorr ne présentent aucune tête géante et, de même, ceux soumis à une coloration au bleu de toluidine ne montrent aucune augmentation de la coloration du noyau.

Des observations similaires avaient déjà été réalisées sur des spermatozoïdes humains et de macaque (*Macaca fascicularis*) : environ 30 % des gamètes de la tête de l'épididyme, non fixés, séchés à l'air libre, puis colorés, présentent une augmentation de la taille de la tête, qui n'est pas visible chez les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme. Cette expansion de la tête des spermatozoïdes disparaît si ceux-ci sont fixés en suspension dans l'éthanol, préalablement au séchage sur lame, indiquant que cette augmentation de la taille de la tête des spermatozoïdes est un artéfact expérimental (Yeung *et al.*, 1997 ; Cooper, 2012). Pour expliquer ce phénomène, l'équipe du Dr. T.G. Cooper (Münster, Allemagne) a proposé que la membrane des spermatozoïdes de la tête de l'épididyme, moins mature que celle des gamètes de la queue de l'épididyme, serait plus fragile et se romprait lors de la déshydratation rapide des cellules non fixées préalablement. En accord avec cette assertion, nos résultats obtenus lors d'un test en conditions hypo-osmotiques indiquent qu'à 4 mois la proportion de spermatozoïdes de la tête et de la queue de l'épididyme des souris DKO dont la membrane est intègre ($14,83 \pm 1,46$ % et $6,73 \pm 1,03$ %, respectivement) est moins importante que celle présente chez les souris WT ($23,72 \pm 3,57$ % et $12,02 \pm 0,79$ %, respectivement). Cependant, cette diminution de l'intégrité de la membrane concerne aussi les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme des souris DKO qui ne présentent pourtant pas de spermatozoïdes à tête géante en coloration de Shorr ou au bleu de toluidine. Par ailleurs, même chez les organismes résistants à la dessiccation, un cycle de déshydratation/réhydratation brutal des cellules entraîne une perméabilisation de la membrane plasmique causant la mort des cellules (Simonin *et al.*, 2007). Ainsi, étant donné que seul le compartiment nucléaire est touché par l'augmentation de volume, il est possible que cet artéfact soit le reflet d'une structuration moins stable de la chromatine spermatique dans le noyau des gamètes affectés. L'ADN chargé ayant une grande affinité pour l'eau polaire (Schneider *et al.*, 1998 ; Fuller *et al.*, 2004 ; Nakano *et al.*, 2012), il agirait comme une éponge dont l'expansion serait entravée en cas de réticulation importante de la chromatine spermatique par des ponts disulfures. Nos résultats indiqueraient alors que la chromatine des spermatozoïdes de la tête de l'épididyme des souris DKO présente une diminution du pontage disulfure entre les protamines par rapports à celle des souris WT. De plus, la morphologie des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme des souris DKO n'étant pas altérée après un cycle de déshydratation/réhydratation, ils indiqueraient également qu'un mécanisme de compensation de la perte de snGPx4 est mis en place au sein de l'épididyme, afin de mener à bien la maturation de la chromatine spermatique.

Les premiers travaux portant sur la fonction de snGPx4 ont révélés qu'il s'agit d'une enzyme capable de réduire différents peroxydes (H_2O_2 , phospholipides hydroperoxydés) et qu'elle est impliquée dans la condensation de la chromatine des spermatides et des spermatozoïdes (Pfeifer *et al.*, 2001). L'isoforme mitochondriale de GPx4, retrouvée presque exclusivement dans les

spermatides, est également impliquée dans une activité de pontage disulfure entre elle-même et d'autres protéines de la capsule mitochondriale de la pièce intermédiaire du flagelle (Ursini *et al.*, 1999 ; Maiorino *et al.*, 2005). Ces données, associées à l'analyse phénotypique des souris *snGPx4*^{-/-} montrant un retard de condensation de la chromatine spermatique et une augmentation de la quantité de thiols libres dans les gamètes (Conrad *et al.*, 2005), suggèrent fortement que le rôle de snGPx4 dans le noyau spermatique est de réaliser des ponts disulfures entre les protamines afin de rapprocher les brins d'ADN entre eux pour condenser la chromatine et en stabiliser la structure. Afin de déterminer si l'épididyme des souris DKO compense la diminution d'activité de pontage disulfure provoquée par l'absence de snGPx4, l'expression des gènes codant pour différentes enzymes à activité disulfide isomérase ou impliquées dans leur régénération a été analysée par PCR quantitative. Les résultats révèlent que plusieurs de ces gènes voient leur expression augmenter. Les protéines de la famille des Pdia (*protein disulfide isomerase family A*) ont une activité de pontage disulfure et de déplacement de ces ponts aux seins des protéines. Elles sont principalement connues pour être présentes dans le réticulum endoplasmique (RE) des cellules où elles participent au repliement correct des protéines nouvellement synthétisées. Cependant, depuis une dizaine d'années, les données indiquant que ces protéines peuvent être localisées en dehors du réticulum se multiplient. Dans le cas des spermatozoïdes, certaines Pdia ont été retrouvées dans le contenu de l'acrosome ou associées à la membrane, sur la tête ou le flagelle, en fonction des espèces et du stade de maturation des gamètes. Les résultats de nos analyses ont montré que, parmi les Pdia produites par l'épididyme, Pdia5, Pdia6 et Pdia10 voyaient leur expression augmenter dans la tête et dans la queue de l'épididyme, de même que Pdia3 et Pdia11 dans la queue de l'épididyme uniquement. Les protéines de la famille des thiorédoxines, qui sont capables de régénérer le site actif des Pdia, subissent également des variations de leur expression, dont Txnl1 dans la tête de l'épididyme et Trx1 dans la queue de l'épididyme. Pdia5, Pdia10 et Pdia11 n'ont pour l'instant jamais été décrites en dehors du RE, mais elles sont probablement présentes dans le RE des cellules de l'épithélium. Elles ont toutes les trois été retrouvées dans les épididymosomes de la tête de l'épididyme de taureau (Girouard *et al.*, 2011). Chez la souris, Pdia3 et Pdia6 ont été retrouvées dans le contenu de l'acrosome ainsi qu'associées à la membrane des spermatozoïdes (Bohring *et al.*, 2001 ; Ellerman *et al.*, 2006 ; Stein *et al.*, 2006 ; Kameshwari *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2013). Si les protéines présentes dans l'acrosome sont produites lors de la spermiogenèse, celles associées à la membrane peuvent provenir des sécrétions de l'épithélium épididymaire. Le résultat de cette augmentation de la production de Pdia et de thiorédoxines est une diminution significative de la quantité de thiols libres dans les spermatozoïdes de la tête de l'épididyme des souris DKO par rapport à celle observée chez les souris WT. Néanmoins, aucune protéine à activité disulfide isomérase autre que snGPx4 n'a été décrite dans le noyau spermatique pour le moment. Ainsi, cette augmentation de la production de Pdia ne semble à priori pas pouvoir compenser l'absence de snGPx4 et la diminution de la quantité de thiols libres concerne peut-être plus les protéines membranaires que nucléaires. Pourtant, la diminution de l'incorporation de la CMA3 dans la chromatine spermatique entre la tête et la queue de l'épididyme, ainsi que la résistance de la chromatine des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme à un stress induit par un cycle de déshydratation/réhydratation indiquent que la condensation épididymaire de la chromatine des gamètes a bien lieu chez les souris DKO. Ces données suggèrent donc qu'il existe un autre mécanisme dans le noyau spermatique permettant de condenser la chromatine. Cette condensation pourrait être due à une ou plusieurs autres enzymes réalisant du pontage disulfure ou être liée à un mécanisme ne faisant pas intervenir ce pontage. Certains travaux ont déjà évoqué cette hypothèse

en suggérant une poursuite de la déphosphorylation des protamines (Yossefi *et al.*, 1994). Cependant, ce mécanisme, qu'il soit complémentaire ou de substitution, ne corrige pas complètement les défauts de la condensation de l'ADN engendrés par l'absence de snGPx4 car, si les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme sont soumis à des conditions réductrices, le nombre de gamètes présentant un ADN entièrement décondensé est deux fois plus important chez les souris DKO que chez les souris WT. Ainsi, au final, les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme des souris DKO présentent un défaut de condensation de la chromatine, qui n'est détectable que lorsque ces cellules sont soumises à un stress réducteur, suggérant une diminution du pontage disulfure entre les protamines associées à l'ADN. Ainsi, chez les souris DKO, le retard de condensation de la chromatine spermatique et la fragilité de la structure de celle-ci peuvent potentiellement exposer l'ADN à des molécules réactives toxiques, comme les EOR.

Les souris DKO n'exprimant pas GPx5, la présence d'un stress oxydant et des dommages qui l'accompagnent a été recherchée. Le moyen le plus évident de prouver la présence d'un stress oxydant dans l'épididyme est de montrer l'augmentation de la concentration en peroxyde d'hydrogène dans le fluide épидидymaire ou dans le tissu entier. Cependant, nos tentatives de dosage de l'H₂O₂ se sont soldées par un échec à cause de la petite taille de l'épididyme chez la souris et notre incapacité à obtenir un volume suffisant de fluide. Les concentrations en H₂O₂ restent en dessous du seuil de détection des différentes méthodes de dosage. Notre seul recours a été de démontrer l'augmentation de la réponse antioxydante du tissu, indicative de la présence d'un déséquilibre du statut redox de l'épididyme en faveur d'un milieu pro-oxydant. Pour cela, deux approches ont été employées : la quantification des transcrits des gènes codant pour différentes enzymes antioxydantes et une mesure de l'activité enzymatique glutathion peroxydase sur des extraits protéiques de tissus. L'analyse de l'activité enzymatique glutathion peroxydase a été réalisée dans la tête et la queue de l'épididyme, ainsi que dans le foie des souris WT et DKO. Les résultats indiquent des variations significatives de l'activité enzymatique antioxydante entre les deux génotypes dans l'épididyme, mais pas dans le foie. Ainsi, le déséquilibre du statut redox chez les souris DKO semble limité à l'épididyme, lieu majeur de l'expression de GPx5, et n'est pas systémique. Les variations observées dans l'épididyme vont toutes dans le sens d'une augmentation de l'activité antioxydante chez les souris DKO par rapport aux souris WT. Cependant, cette activité enzymatique est variable en fonction des régions de l'épididyme et de l'âge des souris, y compris chez les souris WT. En effet, dans la tête de l'épididyme, l'activité antioxydante est faible à 4 mois, mais augmente considérablement à 8 mois, atteignant presque celle présente dans le foie, organe de référence dont l'activité antioxydante est très élevée. Dans la queue de l'épididyme, l'évolution inverse est observée : à 4 mois, l'activité est plus forte que dans la tête de l'épididyme, puis elle diminue à 8 mois. De façon générale, la variation de l'activité enzymatique antioxydante en fonction de la région et de l'âge est similaire chez les souris DKO. Cependant, il existe une augmentation significative de cette activité dans la queue de l'épididyme des souris DKO dès 4 mois par rapport aux souris WT. Dans la tête de l'épididyme, cette augmentation de l'activité antioxydante par rapport aux souris WT n'est observable qu'à partir de 8 mois. Le plus étonnant concernant ces résultats est qu'ils représentent normalement l'activité enzymatique glutathion peroxydase uniquement, car, en dehors du substrat, seuls du glutathion réduit et de la glutathion réductase ont été ajoutés au milieu réactionnel. Or, l'expression des autres GPx synthétisées par l'épithélium épидидymaire diminue chez les souris DKO par rapport à celle des souris WT, en particulier GPx1 et GPx4 dans la tête de l'épididyme. GPx3 est la seule dont l'expression est maintenue chez les

souris DKO. Il semble alors que ce dosage indirect de l'activité enzymatique ne montre pas véritablement l'activité des GPx en particulier mais l'activité antioxydante en générale. En effet, il s'agit ici de la vitesse de consommation du NADPH, qui est utilisé non seulement pour renouveler le glutathion mais également les thiorédoxines et la vitamine C, elles-mêmes régénérant respectivement les peroxyrédoxines/Pdia et différentes molécules antioxydantes non enzymatiques. Testant l'activité enzymatique d'extraits protéiques et non de protéines purifiées, il est possible d'envisager que de la thiorédoxine réductase, des Trx, des Prx et mêmes des molécules antioxydantes non enzymatiques aient été apportées par l'extrait en suffisamment grandes quantités pour influencer la consommation du NADPH dans le milieu réactionnel. Un des moyens de parvenir à doser cette activité de façon plus spécifique serait de réaliser ce dosage en présence de différents inhibiteurs. Il serait par ailleurs intéressant de réaliser un dosage de l'activité enzymatique des thiorédoxines, afin de vérifier que celle-ci est en augmentation, parallèlement à l'augmentation de l'expression de certaines Trx (Trx1 et Txnl1).

À 4 mois, l'expression de SOD3, qui est une SOD sécrétée, est diminuée dans la queue de l'épididyme des souris DKO par rapport aux souris WT. Cependant, à 8 mois, l'expression de ce gène est normale, tandis que celle du gène codant pour la catalase est triplée. Ces données semblent indiquer qu'à 4 mois l'épididyme parvient à gérer l'excès de H_2O_2 en limitant sa formation, alors qu'à 8 mois, la concentration en H_2O_2 serait telle que la catalase serait fortement induite pour pouvoir l'éliminer.

Concernant les autres enzymes antioxydantes exprimées dans l'épididyme, les Trx et les Prx semblent prendre la place des GPx dans l'élimination des EOR et des lipides hydroperoxydés. Dans le réseau des molécules antioxydantes, les Trx sont chargées de régénérer le site actif des Prx, afin de leur permettre de recommencer encore et encore la réaction de réduction des EOR et des lipides peroxydés. Ainsi, en augmentant à la fois l'expression des Trx et des Prx, même modérément, l'épididyme des souris DKO peut potentiellement générer une augmentation très importante de l'activité enzymatique antioxydante. Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression de certaines Trx (Txrl1 et Txr1) augmente à 4 mois. Pour ce qui est de leurs partenaires, les Prx, à 4 mois, seule l'expression du gène codant pour la Prx3 est augmentée dans la queue de l'épididyme des souris DKO. Ce n'est qu'à partir de 8 mois que l'expression des gènes *prdx3* et *prdx4* augmente à la fois dans la tête et dans la queue de l'épididyme. Ces gènes codent pour les protéines Prx3, qui est mitochondriale, et Prx4 qui peut être cytosolique, golgienne ou sécrétée. Les données sur les peroxyrédoxines dans le tractus génital mâle, et en particulier dans l'épididyme, sont peu nombreuses et montrent des variations entre les espèces considérées. Prx3 n'a semble-t-il été étudiée que lors de la spermatogenèse où elle est exprimée par les cellules germinales (Onorato *et al.*, 2008). Prx 4 joue peut-être un rôle dans la formation de l'acrosome lors de la spermiogenèse mais n'est plus présente dans les spermatozoïdes chez le rat (Sasagawa *et al.*, 2001). Cette enzyme est aussi impliquée dans la protection des cellules germinales contre le stress oxydant chez la souris (Iuchi *et al.*, 2009) et elle est retrouvée dans les spermatozoïdes et le plasma séminal chez l'homme (O'Flaherty & Souza, 2011). Prx4 est également présente dans les épидидymosomes chez le taureau et l'homme (Thimon *et al.*, 2008 ; Girouard *et al.*, 2011).

Par ailleurs, même si les Prx sont leurs partenaires principaux, les Trx peuvent également régénérer le site actif de GPx3. Ainsi, même sans augmenter son expression, l'activité enzymatique de GPx3 peut potentiellement être augmentée par les Trx. Trx1 et Txrl1 sont toutes les deux

majoritairement décrites comme cytosoliques, cependant, Trx1 a également été montrée comme pouvant être nucléaire ou membranaire (World *et al.*, 2011) et être sécrétée hors des cellules (Rubartelli *et al.*, 1992). Elle est également retrouvée dans le sang (Miyamoto *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2010). Txnl1 est de découverte relativement récente (Lee *et al.*, 1998) et n'a pour l'instant pas été rapportée en dehors du cytosol des cellules. Dans l'épididyme, on sait uniquement que Trx1 est présente dans les épididymosomes de taureau et de sanglier, tandis que Txnl1 n'est retrouvé que dans ceux de taureau (Girouard *et al.*, 2011 ; Guyonnet *et al.*, 2011). Ainsi, il est possible que, si elle est sécrétée dans le fluide épididymaire, Trx1 puisse régénérer GPx3 et augmenter son activité enzymatique. Or, en absence de GPx5, GPx3 devient la seule GPx encore présente dans le fluide épididymaire en contact direct avec les spermatozoïdes. Le fait que ce soit la seule GPx épididymaire dont l'expression n'est pas inhibée chez les souris DKO est alors plus compréhensible.

La diminution de l'expression des gènes codant pour les GPx au profit de l'augmentation de celle des gènes codant pour les Trx et les Prx reste malgré tout intrigante. En effet, la voie canonique antioxydante est généralement considérée comme la triade « SOD/GPx/catalase ». De plus, les souris *gpx5*^{-/-} gèrent le stress oxydant causé par l'absence de GPx5 en surexprimant les enzymes GPx et catalase de cette voie antioxydante classique. Alors pourquoi observe-t-on une réaction si différente dans l'épididyme des souris DKO ? Il convient de se souvenir que ce nouveau modèle présente en plus un déficit en pontage disulfure. Ce dernier est contrebalancé par une surexpression des Pdia. Or, leur site actif est régénéré par les Trx qui sont également impliquées dans la protection antioxydante par l'intermédiaire des Prx. D'un point de vue énergétique, il apparaît bien plus intéressant pour le tissu de dépenser ses ressources dans la production d'enzymes intervenant dans la compensation des deux déficits, pontage disulfure et élimination des EOR, que de maintenir la production des enzymes classiques impliquées dans une activité plus spécifique.

Parmi les autres enzymes antioxydantes exprimées par l'épididyme, les GST voient également leur expression augmenter dans la tête comme dans la queue de l'épididyme, et ceci dès 4 mois. Les deux classes de GST que nous avons recherchées sont normalement des enzymes cytosoliques mais, chez différents mammifères, ces protéines ont également été retrouvées dans le plasma séminal et sur les spermatozoïdes eux-mêmes (Shaha *et al.*, 1988 ; Aravinda *et al.*, 1995 ; Veri *et al.*, 1993 ; Knapen *et al.*, 1999). Ces enzymes sont chargées à la fois d'éliminer les molécules toxiques, dont celles génératrices d'EOR et les produits de la peroxydation lipidique, par conjugaison avec le GSH et de réduire les lipides peroxydés, y compris les stérols et les phospholipides hydroperoxydés, limitant ainsi la poursuite de la cascade de réactions de la peroxydation lipidique. Dans les deux cas, elles jouent un rôle direct dans la limitation de la quantité de produits finaux de la peroxydation lipidique capables de réagir avec l'acide thiobarbiturique. Cette augmentation de l'expression des GST dans l'épididyme, associée à celle des Trx et des Prx, serait donc une explication logique à la diminution inattendue de la concentration de ces produits dans le tissu épididymaire et dans les spermatozoïdes des souris DKO par rapport à ceux des souris WT.

Les autres dommages oxydants qui ont été analysés dans la queue de l'épididyme concernent l'intégrité de l'ADN spermatique. En effet, le rôle des spermatozoïdes est de fournir au futur embryon un ADN le plus intègre possible, afin de lui assurer un développement normal et une bonne santé après la naissance. Les dommages oxydants de l'ADN qui ont été recherchés

sont la fragmentation des brins et l'oxydation des bases azotées. Dans les deux cas, une augmentation des atteintes oxydantes a pu être observée. Dès 4 mois, le nombre de gamètes dont l'ADN est fragmenté est multiplié par 5 chez les souris DKO par rapport aux souris WT. De plus, le taux de fragmentation de l'ADN spermatique chez les souris DKO ($3,76 \pm 0,40 \%$) est supérieur à ceux observés chez les souris *gpx5*^{-/-} ($1,58 \pm 0,15 \%$, Chabory *et al.*, 2009) et les souris *sn-gpx4*^{-/-} ($1,38 \pm 0,07 \%$) entre 4 et 6 mois. L'absence conjuguée de snGPx4 et GPx5 a donc un effet additif sur la fragmentation de l'ADN spermatique. Si les cassures de l'ADN générées chez les souris *gpx5*^{-/-} sont dues à une augmentation de la concentration en EOR dans le fluide épидидymaire, il est difficile de savoir si celles observées chez les souris *sn-gpx4*^{-/-} sont une conséquence des défauts de la condensation de la chromatine laissant l'ADN plus exposé ou d'un bouleversement des processus de réparation des cassures produites lors des échanges des protéines nucléaires pendant la spermiogenèse. De plus, ces deux possibilités ne sont pas mutuellement exclusives. Quant à l'oxydation des bases azotées de l'ADN qui a été analysée par immunomarquage des bases 8-OHdG sur les spermatozoïdes, on peut constater que ces dommages ne sont pas visibles à 4 mois mais seulement à 8 mois. Ce délai est probablement dû à la forte réponse antioxydante produite par la queue de l'épididyme à 4 mois. La diminution de cette réponse avec l'âge, clairement visible à 8 mois, laisserait alors les spermatozoïdes plus exposés aux EOR présents dans le fluide épидидymaire.

L'ensemble des données observées chez les souris DKO indique que l'épididyme est capable de réaliser une prise en charge efficace d'un excès d'EOR, en augmentant la production de diverses enzymes antioxydantes agissant de différentes manières, dans différents compartiments. Cependant, cette protection antioxydante devient moins efficace avec l'âge, laissant les spermatozoïdes exposés. Par ailleurs, l'épididyme tente également de compenser l'absence de snGPx4 en augmentant la production de protéines disulfide isomérases, mais n'y parvient pas complètement. Pour mieux comprendre les interactions entre les différents acteurs enzymatiques de la régulation du statut redox et de l'activité de pontage disulfure dans l'épididyme, il faudrait déterminer la localisation de chacune de ces enzymes, par immunofluorescence sur des coupes de tissu épидидymaire et des frottis de spermatozoïdes. Ceci permettrait de déterminer plus précisément le rôle de chaque protéine dans ce réseau enzymatique, définissant ainsi si l'augmentation du pontage disulfure peut ou non concerner le noyau spermatique et si les enzymes antioxydantes peuvent protéger les spermatozoïdes au plus près ou seulement depuis l'épithélium épидидymaire. En effet, dans le domaine de l'élimination des EOR, même si certaines d'entre elles comme l'H₂O₂ peuvent traverser les membranes, une présence presque exclusive des enzymes dans l'épithélium limiterait l'efficacité de la protection antioxydante des spermatozoïdes.

Chez les souris DKO, un défaut de condensation de la chromatine spermatique dans la tête comme dans la queue de l'épididyme est observée, probablement parce que l'augmentation de l'activité de pontage disulfure ne concerne pas ou peu le noyau spermatique. Cette diminution de la condensation de la chromatine spermatique réduit la protection de l'ADN face aux EOR en excès. Ainsi, si les tissus et les membranes des gamètes sont protégés de l'oxydation, l'ADN spermatique reste vulnérable aux attaques. La protection épидидymaire de l'ADN spermatique est donc réduite, ce qui provoque l'apparition de dommages oxydants sur l'ADN tels que la fragmentation des brins et l'oxydation des bases azotées, en particulier avec la diminution de l'activité enzymatique antioxydante au cours du vieillissement. Ces dommages oxydants, qui ne

pourront être réparés que par l'ovocyte après la fécondation, peuvent être à l'origine de mutations dans le génome de l'embryon. Ces mutations risquent de conduire à des défauts de développement de l'embryon ou du fœtus, provoquant des malformations, voire la mort de l'individu. C'est pourquoi nous avons réalisé une série de tests de fertilité sur un groupe de souris mâles DKO. De 3 à 17 mois, nous les avons mis à plusieurs reprises en croisement naturel avec des souris femelles de 3 mois dont le cycle sexuel avait été synchronisé. Contrairement à nos attentes, lors de ces croisements, nous n'avons pas pu établir de diminution de la fertilité chez les souris DKO par rapport aux souris WT, quel que soit l'âge des mâles. Il semble donc que, malgré l'augmentation des dommages oxydants sur l'ADN spermatique, celui-ci ait été suffisamment bien protégé pour que l'ovocyte ne soit pas dépassé par le nombre de réparation de l'ADN paternel à effectuer. Il est également possible que les ovocytes de ces jeunes souris femelles aient une capacité de réparation de l'ADN très élevée ou que la traversée du tractus génital femelle réalise une sélection des meilleurs gamètes, limitant les risques de dommages importants sur l'ADN paternel. Pour évaluer ces éventualités, il pourrait être intéressant de réaliser ces mêmes croisements par fécondation *in vitro* (FIV) avec des ovocytes de souris femelles âgées, afin de réduire les capacités de réparation de l'ovocyte et de supprimer toute sélection naturelle des spermatozoïdes les moins endommagés. Par ailleurs, le stress oxydant et l'augmentation du pontage disulfure sur les spermatozoïdes des souris DKO peuvent avoir modifié de façon plus ou moins importante les protéines membranaires et de surface impliquées dans la fixation des spermatozoïdes au tractus femelle — qui est nécessaire au déroulement de la capacitation —, ainsi que dans la fixation à la zone pellucide. Il serait donc intéressant de réaliser des tests *in vitro* d'attachement à la zone pellucide pour évaluer les dommages potentiellement subis par les protéines membranaires spermatiques.

II. La localisation des dommages oxydants sur l'ADN spermatique

Certaines études font état d'une liaison entre l'oxydation de l'ADN spermatique, la fragmentation de l'ADN et l'infertilité masculine (Aitken *et al.*, 2010). En effet, les dommages oxydants à l'ADN, tels que la fragmentation des brins et la modifications des bases azotées, diminuent la qualité des embryons (Muriel *et al.*, 2006) et augmentent les risques de fausses-couches (Zini & Sigman, 2009). Ainsi, lorsque l'indice de fragmentation de l'ADN (DFI) est supérieur à 30-40 %, le taux de grossesse est significativement réduit (Evenson & Wixon, 2008). Les techniques de manipulation et de cryoconservation des spermatozoïdes lors des protocoles de procréation médicalement assistées sont connus pour générer des dommages oxydants sur les gamètes (Watson, 2000 ; Zribi *et al.*, 2010 ; Meyers, 2012), qui sont parfois déjà endommagés du fait de l'infertilité masculine en jeu. Afin de mieux comprendre comment ces dommages oxydants peuvent provoquer des anomalies du développement embryonnaire, nous avons étudié leur localisation spatiale et chromosomique dans des spermatozoïdes oxydés *in vivo* chez les souris WT et *gpx5*^{-/-} (Chabory *et al.*, 2009) et *in vitro*, par incubation des spermatozoïdes de souris WT avec de l'H₂O₂.

Une approche par immunocytochimie anti-8-OHdG sur les spermatozoïdes épидидymaire de la queue de l'épididyme a démontré que les dommages oxydants n'étaient pas répartis de façon uniforme dans le noyau des spermatozoïdes. En effet, que ce soit dans les spermatozoïdes oxydés

in vivo (WT et *gpx5*^{-/-}) ou ceux soumis à un traitement avec de l'H₂O₂, ces dommages sont essentiellement localisés en périphérie du noyau spermatique et sur une large région à la base du noyau, proche du site de fixation du flagelle. Ces résultats nous ont amenés à nous interroger sur la présence de points de fragilité de l'ADN spermatique face aux EOR, en relation avec l'organisation de la chromatine des gamètes. Nous avons donc étudié la localisation des différents composants protéiques de cette chromatine pour la comparer avec celle des dommages oxydants dans le noyau. Les résultats obtenus par immunocytochimie indiquent que la protamine Prm1 est répartie dans tout le génome spermatique murin, bien qu'une légère accentuation du marquage de Prm1 soit visible au centre du noyau. Au contraire, les marquages de l'histone canonique H3 et du variant de H2B spécifique du testicule (TH2B) se situent majoritairement en périphérie du noyau spermatique murin, avec une intensité des marquages plus importante dans la région basale du noyau. Ces profils de marquage rappellent fortement celui de la guanine oxydée, ce que confirme le co-marquage de la 8-OHdG avec l'histone H3. Cependant, cette co-localisation n'est pas parfaite mais partielle. Ces résultats semblent indiquer que l'ADN associé aux nucléosomes est plus exposé aux EOR que l'ADN lié aux Prm. Ceci serait à mettre en lien avec le fait que l'ADN lié aux Prm est plus condensé que l'ADN associé aux nucléosomes et est donc moins accessible aux molécules extérieures potentiellement nuisibles. De plus, la localisation périphérique des dommages peut également être en partie due au fait, qu'à cause de cette chromatine spermatique si condensée, le centre du noyau est difficilement accessible aux EOR, ce qui expliquerait que la co-localisation de la guanine oxydée avec l'histone H3 ne soit que partielle.

Le marquage de la guanine oxydée est généralement plus intense à la base du noyau que sur le reste de la périphérie nucléaire. Cette localisation particulière évoque celle de l'*annulus* nucléaire, une structure protéique à l'intérieur du noyau spermatique, faisant partie de la matrice nucléaire et à laquelle est lié l'ADN (figure 34) (Ward & Coffey, 1989). Nous avons donc également étudié la localisation des régions d'attachement de l'ADN à la matrice (MAR) dans les noyaux spermatiques murins. Pour cela, nous avons déterminé la distribution de la protéine TOPO IIβ, une enzyme à activité endonucléase associée aux MAR. Le profil de marquage de TOPO IIβ montre une répartition périphérique et basale des MAR, similaire à celles de la guanine oxydée, de H3 et de TH2B, ce que confirme le co-marquage de la 8-OHdG et de TOPO IIβ. Ces résultats sont en accord avec la théorie selon laquelle l'ADN lié à la matrice nucléaire au niveau des MAR et situé entre les tores d'ADN associé aux Prm est enrichi en nucléosomes par rapport au reste de la chromatine spermatique (Ward, 2010 ; Johnson *et al.*, 2011). La sensibilité à l'oxydation des séquences d'ADN liées aux MAR pourrait poser d'importants problèmes dès les tous premiers stades de développement suivant la fécondation. En effet, ces séquences sont importantes pour la formation du pronucléus mâle et la réplication du génome paternel nécessaire à la première division du zygote (Shaman *et al.*, 2007a, 2007b).

L'immunomarquage des protéines nucléaires spermatiques requiert systématiquement une décondensation préalable de la chromatine par l'utilisation d'un agent réducteur des ponts disulfures, ici le dithiothréitol (DTT). Certains spermatozoïdes issus de la queue de l'épididyme sont plus sensibles à ce traitement que d'autres et forment alors un halo de boucles d'ADN sortant de la membrane nucléaire, comme décrit précédemment (Ward *et al.*, 1989). Ce halo d'ADN entourant le noyau spermatique comporte des nucléosomes, comme le montrent les immunomarquages de H3 et de TH2B. Un comptage du nombre de spermatozoïdes présentant un

halo visible par marquage de TH2B montre que les spermatozoïdes des souris *gpx5*^{-/-} sont plus sensibles au traitement par le DTT que ceux des souris WT. Ceci est en accord avec la diminution du pontage disulfure dans la chromatine des gamètes de ces souris *gpx5*^{-/-} et pourrait expliquer la condensation moins importante de la chromatine spermatique dans la queue de l'épididyme de ces souris (Chabory *et al.*, 2009). Mais, ces résultats pourraient également être dus à une instabilité plus importante de la structure de la chromatine spermatique des souris *gpx5*^{-/-}, en lien avec l'augmentation de la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes (Chabory *et al.*, 2009). Par ailleurs, le co-marquage de la guanine oxydée et de H3 montre que, lors de la formation d'un halo de boucles d'ADN hors du noyau, l'ADN oxydé reste systématiquement piégé à l'intérieur de la membrane nucléaire, dans la périphérie du noyau. Ces résultats ont été confirmés par une approche biochimique au cours de laquelle les boucles d'ADN des halos sont clivées par l'enzyme nucléase micrococcale (MNase) puis séparées de l'ADN maintenu dans les noyaux. L'ADN contenu dans ces deux fractions est purifié puis analysé par slot blot avec un anticorps anti-8-OHdG. Les résultats obtenus indiquent que les boucles d'ADN des halos ne présentent que très peu d'oxydation et que la quasi-totalité de l'ADN oxydé reste confiné à l'intérieur des membranes nucléaires, comme le montre le co-marquage de la guanine oxydée et de l'histone H3. L'ensemble de ces données suggèrent que les séquences d'ADN oxydées sont liées à la matrice nucléaire et que toutes les séquences d'ADN associées à des nucléosomes ne sont pas sensibles à l'oxydation, en particulier celles qui ne sont pas associées à la matrice nucléaire. De plus, une analyse par dot blot des protéines associées à chaque fraction d'ADN obtenues par digestion par la MNase indique qu'une grande partie des nucléosomes comportant TH2B sont associés aux boucles d'ADN peu oxydées, tandis que H3 serait présente dans les deux fractions d'ADN à la fois, ce qui coïncide avec les différents types de profil de marquage obtenu pour TH2B et H3 sur les halos d'ADN spermatiques.

Pour analyser plus finement la localisation des dommages oxydants sur la chromatine spermatique nous avons réalisé une immunoprécipitation de l'ADN spermatique oxydé avec un anticorps dirigé contre la 8-OHdG, à partir des spermatozoïdes issus des souris WT, *gpx5*^{-/-} et DKO. Le séquençage des fragments d'ADN oxydé obtenus est actuellement en cours d'analyse. Les premiers résultats préliminaires indiquent que tous les chromosomes ne sont pas aussi sensibles à l'oxydation. De manière générale, il semblerait que les chromosomes de plus petite taille soient les plus oxydés dans les spermatozoïdes, en particulier le chromosome 19. Cette sensibilité accrue à l'oxydation pourrait être due à la localisation des chromosomes dans le noyau. En effet, si les chromosomes spermatiques murins sont associés à la périphérie membranaire par les télomères, comme c'est le cas chez l'homme, il est possible que le corps des petits chromosomes soit plus proche de la périphérie du noyau. Pour le vérifier, il serait intéressant de réaliser un marquage de différents chromosomes par FISH et de déterminer l'agencement des différentes parties des chromosomes (centromères, télomères) par FISH ou par immunocytochimie avec des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques de ces régions, comme le CENP-A pour le centromère.

Par la suite, pour confirmer que les séquences d'ADN associées aux nucléosomes sont plus sensibles à l'oxydation que ceux associés aux Prm, il serait nécessaire de comparer nos données de séquençage de l'ADN oxydé avec celles concernant la répartition des histones et des protamines dans les spermatozoïdes murins (Base de données GEO/NCBI : GSE15941, Arpanahi *et al.*, 2009). Chez l'homme, une approche similaire par séquençage à haut débit a montré que les régions de l'ADN spermatique restant associées aux nucléosomes concernent les promoteurs des gènes

impliqués dans la spermatogenèse, le développement embryonnaire et qui codent pour des microARN ou qui sont soumis à l’empreinte parentale (Hammoud *et al.*, 2009). La comparaison de nos résultats à ces données serait intéressante. Les premiers résultats indiquent que 47 % des séquences fortement touchées par l’oxydation se situent dans des *loci* géniques et que 3 % de ces séquences sont localisées à moins de 5 kb en amont ou aval d’un site d’initiation de la transcription. La répartition des gènes selon leur ontologie montre un enrichissement en processus de développement (9,1 %) et de communication cellulaire (6,9 %). Or, ces processus sont particulièrement importants lors du développement embryonnaire et pour le bon fonctionnement des tissus.

L’ensemble de nos données montre une sensibilité accrue des régions périphériques de la chromatine spermatique murine à l’oxydation. Ces régions sont également celles qui sont enrichies en nucléosomes persistants. Cependant, toutes les séquences d’ADN associées aux histones ne sont pas sensibles à l’oxydation. En supposant que tous les nucléosomes spermatiques ne soient pas de composition homogène (histones canoniques ou variants d’histones), certaines régions génomiques en assemblage nucléosomal spécifique semblent protégées de l’oxydation, en particulier celles qui sont associées à des nucléosomes composés de TH2B et qui peuvent sortir de la membrane nucléaire sous forme de boucles d’ADN lorsque la chromatine est fortement décondensée. Les régions d’ADN oxydées restent en effet à l’intérieur des membranes, peut-être parce qu’elles correspondent à des MAR et sont donc associées à la matrice nucléaire. Ces régions qui semblent riches en histone H3 et appauvries en variant TH2B apparaissent ainsi dans mon travail plus sensibles à l’oxydation, peut-être du fait de leur exposition à la surface du noyau et/ou d’une conformation plus accessible aux EOR.

Les MAR sont impliquées dans la formation du pronucléus paternel, ainsi que dans la réplication du génome paternel du zygote (Shaman *et al.*, 2007a, 2007b). La manipulation et la cryopréservation des gamètes génère un stress oxydant important (Watson, 2000 ; Zribi *et al.*, 2010 ; Meyers, 2012). Les dommages oxydants sur la chromatine spermatique pourraient donc expliquer pourquoi l’utilisation en FIV et en ICSI de spermatozoïdes déjà très fragmentés auparavant aboutissent à une diminution de la qualité des embryons (Muriel *et al.*, 2006). Chez les hommes consultant pour une infertilité, la mesure supplémentaire de la guanine oxydée dans la chromatine des spermatozoïdes pourrait prédire plus efficacement les chances de succès des protocoles de FIV et d’ICSI que la seule mesure de l’indice de fragmentation de l’ADN spermatique, puisqu’elle ciblerait plus spécifiquement l’analyse de l’oxydation des MAR.

III. Les effets d’une supplémentation orale antioxydante sur la fonction de reproduction des souris mâles

[Cette partie du manuscrit est censurée pour des raisons de confidentialité.]

IV. Conclusion

La maturation et la protection des spermatozoïdes dans l'épididyme nécessitent un équilibre parfait entre un déficit et un excès en EOR. Cet équilibre est maintenu par un ensemble de molécules antioxydantes enzymatiques ou non qui fonctionnent en coopération. Parmi ces enzymes se trouvent les glutathion peroxydases, dont GPx5, qui élimine l'H₂O₂ en le transformant en eau, et snGPx4, qui réalise des ponts disulfures entre les protamines associées à l'ADN spermatique afin de condenser la chromatine des gamètes pour protéger l'ADN. La caractérisation du phénotype du modèle murin *gp5;sn4*^{-/-} a mis en évidence la capacité de l'épididyme à maintenir cet équilibre en modulant l'expression de différentes enzymes antioxydantes, parvenant ainsi à protéger très efficacement les membranes de l'épithélium et des spermatozoïdes de la peroxydation lipidique. Cependant, cette réponse antioxydante épididymaire est apparue insuffisante pour protéger l'intégrité de la chromatine spermatique.

Grâce à nos modèles murins *gp5*^{-/-} et *gp5;sn4*^{-/-}, nous avons pu étudier plus finement la localisation des dommages oxydants sur la chromatine spermatique murine. Ceux-ci sont apparus concentrés dans la périphérie du noyau spermatique, et plus particulièrement à la base du noyau, où est situé l'annulus nucléaire. Cette localisation des dommages correspond aux régions de moindre compaction de l'ADN restant associées aux nucléosomes et liées à la matrice nucléaire dont fait partie l'annulus nucléaire. Si la localisation des dommages oxydants nucléaires spermatiques s'avérait identique chez l'homme, les conséquences en termes de fertilité pourraient être importantes. En effet, différentes approches associées à du séquençage à haut débit ont récemment permis de déterminer que, chez l'homme, ces séquences où persistent des nucléosomes concernent souvent des promoteurs de gènes impliqués dans le développement embryonnaire et de gènes codant pour des microARN ou soumis à l'empreinte parentale. Ainsi, les dommages oxydants sur le génome paternel, parfois mal réparés par l'ovocyte et sources de mutations, pourraient être à l'origine de défauts de développement embryonnaire, pouvant provoquer des fausses-couches et des malformations fœtales.

[Cette partie du manuscrit est censurée pour des raisons de confidentialité.]

RÉFÉRENCES

- Abou-Haila A. & Fain-Maurel M.-A., 1984. Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: Morphological and histochemical characterization. *Anat Rec* **209**, 197–208.
- Adcock I.M. ; Ito K. & Barnes P.J., 2004. Glucocorticoids Effects on Gene Transcription. *Proc Am Thorac Soc* **1**, 247–254.
- Agarwal A. & Said T.M., 2004. Carnitines and male infertility. *Reprod Biomed Online* **8**, 376–384.
- Agarwal A. ; Kashou A.H. & Sekhon L.H., 2012. Oxidative Stress and the Use of Antioxidants for Idiopathic OATs ; Dans : Agarwal A., Aitken R.J., & Alvarez J.G. (Éd.), *Studies on Men's Health and Fertility*, Collection Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Humana Press, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, p. 485–516.
- Ago T. ; Liu T. ; Zhai P. ; Chen W. ; Li H. ; Molkentin J.D. ; Vatner S.F. & Sadoshima J., 2008. A Redox-Dependent Pathway for Regulating Class II HDACs and Cardiac Hypertrophy. *Cell* **133**, 978–993.
- Aitken R.J. & Curry B.J., 2011. Redox Regulation of Human Sperm Function: From the Physiological Control of Sperm Capacitation to the Etiology of Infertility and DNA Damage in the Germ Line. *Antioxid Redox Signal* **14**, 367–381.
- Aitken R.J. ; Clarkson J.S. & Fishel S., 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* **41**, 183–197.
- Aitken R.J. ; Iuliis G.N.D. ; Finnie J.M. ; Hedges A. & McLachlan R.I., 2010. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod* **25**, 2415–2426.
- Allen M.J. ; Bradbury E.M. & Balhorn R., 1997. AFM analysis of DNA-protamine complexes bound to mica. *Nucl Acids Res* **25**, 2221–2226.
- Arand J. ; Spieler D. ; Karius T. ; Branco M.R. ; Meilinger D. ; Meissner A. ; Jenuwein T. ; Xu G. ; Leonhardt H. ; Wolf V. & Walter J., 2012. In Vivo Control of CpG and Non-CpG DNA Methylation by DNA Methyltransferases. *PLoS Genet* **8**, e1002750.
- Aravinda S. ; Gopalakrishnan B. ; Dey C.S. ; Totey S.M. ; Pawshe C.H. ; Salunke D. ; Kaur K. & Shaha C., 1995. A Testicular Protein Important for Fertility Has Glutathione S-Transferase Activity and Is Localized Extracellularly in the Seminiferous Tubules. *J Biol Chem* **270**, 15675–15685.
- Arpanahi A. ; Brinkworth M. ; Iles D. ; Krawetz S.A. ; Paradowska A. ; Platts A.E. ; Saida M. ; Steger K. ; Tedder P. & Miller D., 2009. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res* **19**, 1338–1349.
- Atig F. ; Kerkeni A. ; Saad A. & Ajina M., 2013. Effects of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men. *J Assist Reprod Genet* **1–9**.
- Awda B.J. ; Mackenzie-Bell M. & Buhr M.M., 2009. Reactive Oxygen Species and Boar Sperm Function. *Biol Reprod* **81**, 553–561.
- Aydemir B. ; Onaran I. ; Kiziler A.R. ; Alici B. & Akyolcu M.C., 2007. Increased oxidative damage of sperm and seminal plasma in men with idiopathic infertility is higher in patients with glutathione S-transferase Mu-1 null genotype. *Asian J Androl* **9**, 108–115.
- Baek I.-J. ; Yon J.-M. ; Lee S.-R. ; Kim M.-R. ; Hong J.T. ; Lee B.J. ; Yun Y.W. & Nam S.-Y., 2011. Differential Expression of Gastrointestinal Glutathione Peroxidase (GI-GPx) Gene during Mouse Organogenesis. *Anat Histol Embryol* **40**, 210–218.

- Balhorn R., 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* **8**, 227.
- Barone J.G. ; De Lara J. ; Cummings K.B. & Ward W.S., 1994. DNA organization in human spermatozoa. *J Androl* **15**, 139-144.
- Battin E.E. & Brumaghim J.L., 2009. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys* **55**, 1-23.
- Bedford J.M. & Nicander L., 1971. Ultrastructural changes in the acrosome and sperm membranes during maturation of spermatozoa in the testis and epididymis of the rabbit and monkey. *J Anat* **108**, 527-543.
- Belleannée C. ; Thimon V. & Sullivan R., 2012. Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell Tissue Res.*
- Bench G. ; Corzett M.H. ; Kramer C.E. ; Grant P.G. & Balhorn R., 2000. Zinc is sufficiently abundant within mammalian sperm nuclei to bind stoichiometrically with protamine 2. *Mol Reprod Dev* **56**, 512-519.
- Bentivoglio G. ; Melica F. & Cristoforoni P., 1993. Folinic acid in the treatment of human male infertility. *Fertil Steril* **60**, 698-701.
- Berry M.J., 2005. Insights into the hierarchy of selenium incorporation. *Nat Genet* **37**, 1162-1163.
- Bhutani N. ; Burns D.M. & Blau H.M., 2011. DNA Demethylation Dynamics. *Cell* **146**, 866-872.
- Biliya S. & Bulla L.A., 2010. Genomic imprinting: the influence of differential methylation in the two sexes. *Exp Biol Med (Maywood)* **235**, 139-147.
- Björndahl L. & Kvist U., 2010. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod* **16**, 23-29.
- Blencowe B.J. ; Nickerson J.A. ; Issner R. ; Penman S. & Sharp P.A., 1994. Association of nuclear matrix antigens with exon-containing splicing complexes. *J Cell Biol* **127**, 593-607.
- Bohring C. ; Krause E. ; Habermann B. & Krause W., 2001. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. *Mol Hum Reprod* **7**, 113-118.
- Brewer L.R. ; Corzett M. & Balhorn R., 1999. Protamine-Induced Condensation and Decondensation of the Same DNA Molecule. *Science* **286**, 120-123.
- Brigelius-Flohé R. & Maiorino M., 2013. Glutathione peroxidases. *Biachim Biophys Acta* **In press**.
- Brigelius-Flohé R., 2006. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem* **387**, 1329-1335.
- Brouwers J.F. ; Boerke A. ; Silva P.F.N. ; Garcia-Gil N. ; Gestel R.A. van ; Helms J.B. ; Lest C.H.A. van de & Gadella B.M., 2011. Mass Spectrometric Detection of Cholesterol Oxidation in Bovine Sperm. *Biol Reprod* **85**, 128-136.
- Buard J. ; Barthès P. ; Grey C. & Massy B. de, 2009. Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO J* **28**, 2616-2624.
- Buffone M.G. ; Calamera J.C. ; Brugo-Olmedo S. ; De Vincentiis S. ; Calamera M.M. ; Storey B.T. ; Doncel G.F. & Alvarez J.G., 2012. Superoxide dismutase content in sperm correlates with motility recovery after thawing of cryopreserved human spermatozoa. *Fertil Steril* **97**, 293-298.
- Bulleid N.J. & Ellgaard L., 2011. Multiple ways to make disulfides. *Trends Biochem Sci* **36**, 485-492.

- Burk R.F. & Hill K.E., 2010. 4.13 - Glutathione Peroxidases ; Dans : McQueen C.A. (Éd.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. Elsevier, Oxford, p. 229-242.
- Burk R.F. ; Olson G.E. ; Winfrey V.P. ; Hill K.E. & Yin D., 2011. Glutathione peroxidase-3 produced by the kidney binds to a population of basement membranes in the gastrointestinal tract and in other tissues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**, G32-G38.
- Calamera J. ; Buffone M. ; Ollero M. ; Alvarez J. & Doncel G.F., 2003. Superoxide dismutase content and fatty acid composition in subsets of human spermatozoa from normozoospermic, asthenozoospermic, and polyzoospermic semen samples. *Mol Reprod Dev* **66**, 422-430.
- Caron C. ; Pivot-Pajot C. ; Van Grunsven L.A. ; Col E. ; Lestrat C. ; Rousseaux S. & Khochbin S., 2003. Cdy1: a new transcriptional co-repressor. *EMBO Rep* **4**, 877-882.
- Celeste A. ; Fernandez-Capetillo O. ; Kruhlak M.J. ; Pilch D.R. ; Staudt D.W. ; Lee A. ; Bonner R.F. ; Bonner W.M. & Nussenzweig A., 2003. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* **5**, 675-679.
- Chabory E. ; Damon C. ; Lenoir A. ; Kauselmann G. ; Kern H. ; Zevnik B. ; Garrel C. ; Saez F. ; Cadet R. ; Henry-Berger J. ; Schoor M. ; Gottwald U. ; Habenicht U. ; Drevet J.R. & Vernet P., 2009. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest* **119**, 2074-2085.
- Chabory E., 2009. Caractérisation fonctionnelle de la glutathione peroxydase 5 murine (Thèse de Doctorat).
- Chang B. ; Chen Y. ; Zhao Y. & Bruick R.K., 2007. JMJD6 Is a Histone Arginine Demethylase. *Science* **318**, 444-447.
- Chattopadhyay S. & Pavithra L., 2007. MARs and MARBPs ; Dans : Kundu T.K., Bittman R., Dasgupta D. *et al.* (Éd.), *Chromatin and Disease*, Collection Subcellular Biochemistry. Springer Netherlands, p. 215-234.
- Chen Y. ; Sprung R. ; Tang Y. ; Ball H. ; Sangras B. ; Kim S.C. ; Falck J.R. ; Peng J. ; Gu W. & Zhao Y., 2007. Lysine Propionylation and Butyrylation Are Novel Post-translational Modifications in Histones. *Mol Cell Proteomics* **6**, 812-819.
- Chiva M. ; Saperas N. & Ribes E., 2011. Complex chromatin condensation patterns and nuclear protein transitions during spermiogenesis: Examples from mollusks. *Tissue Cell* **43**, 367-376.
- Chu F.F. ; Doroshov J.H. & Esworthy R.S., 1993. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* **268**, 2571-2576.
- Clermont Y. ; Lalli M. & Bencsath-Makkai Z., 2009. Light-microscopic histology atlas [WWW Document]. *Light-microscopic histology atlas*. URL <http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/>
- Cohen G. & Hochstein P., 1963. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry* **2**, 1420-1428.
- Conrad M. ; Moreno S.G. ; Sinowatz F. ; Ursini F. ; Kölle S. ; Roveri A. ; Brielmeier M. ; Wurst W. ; Maiorino M. & Bornkamm G.W., 2005. The Nuclear Form of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Is a Protein Thiol Peroxidase Contributing to Sperm Chromatin Stability. *Mol Cell Biol* **25**, 7637-7644.
- Cooper T.G., 2012. Comment on the morphology of spermatozoa in air-dried seminal smears. *Int J Androl* **35**, 105-106.

- Da Silva N. ; Cortez-Retamozo V. ; Reinecker H.-C. ; Wildgruber M. ; Hill E. ; Brown D. ; Swirski F.K. ; Pittet M.J. & Breton S., 2011. A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* **141**, 653-663.
- Daban J.-R. & Bermúdez A., 1998. Interdigitated Solenoid Model for Compact Chromatin Fibers. *Biochemistry* **37**, 4299-4304.
- Daban J.-R., 2011. Electron microscopy and atomic force microscopy studies of chromatin and metaphase chromosome structure. *Micron* **42**, 733-750.
- Dacheux J.-L. ; Belleannée C. ; Jones R. ; Labas V. ; Belghazi M. ; Guyonnet B. ; Druart X. ; Gatti J.L. & Dacheux F., 2009. Mammalian epididymal proteome. *Mol Cell Endocrinol* **306**, 45-50.
- Dacheux J.-L. ; Gatti J.L. & Dacheux F., 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* **61**, 7-17.
- Dadoune J.-P. ; Siffroi J.-P. & Alfonsi M.-F., 2004. Transcription in Haploid Male Germ Cells ; Dans : *International Review of Cytology*. Academic Press, p. 1-56.
- Dadoune J.-P., 2003. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech* **61**, 56-75.
- Dandekar S.P. ; Nadkarni G.D. ; Kulkarni V.S. & Puneekar S., 2002. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *J Postgrad Med* **48**, 186-189; discussion 189-190.
- Davis T.L. ; Yang G.J. ; McCarrey J.R. & Bartolomei M.S., 2000. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet* **9**, 2885-2894.
- De Fraipont F. & Richard M.-J., 2009. L'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeur comme marqueur en cancérologie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* **24**, 9-15.
- De Lamirande E. & O'Flaherty C., 2008. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 106-115.
- De Lamirande E. & O'Flaherty C., 2012. Sperm Capacitation as an Oxidative Event ; Dans : Agarwal A., Aitken R.J., & Alvarez J.G. (Éd.), *Studies on Men's Health and Fertility*, Collection Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Humana Press, p. 57-94.
- Dear T.N. ; Campbell K. & Rabbitts T.H., 1991. Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins. *Biochemistry* **30**, 10376-10382.
- Dhar S. ; Thota A. & Rao M.R.S., 2012. Insights into Role of Bromodomain, Testis-specific (Brdt) in Acetylated Histone H4-dependent Chromatin Remodeling in Mammalian Spermiogenesis. *J Biol Chem* **287**, 6387-6405.
- Dong A. ; Yoder J.A. ; Zhang X. ; Zhou L. ; Bestor T.H. & Cheng X., 2001. Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic Acids Res* **29**, 439-448.
- Donovan J. & Copeland P.R., 2010. Threading the Needle: Getting Selenocysteine Into Proteins. *Antioxid Redox Signal* **12**, 881-892.
- Downs J.A. ; Allard S. ; Jobin-Robitaille O. ; Javaheri A. ; Auger A. ; Bouchard N. ; Kron S.J. ; Jackson S.P. & Côté J., 2004. Binding of Chromatin-Modifying Activities to Phosphorylated Histone H2A at DNA Damage Sites. *Mol Cell* **16**, 979-990.
- Drevet J.R. ; Lareyre J.-J. ; Schwaab V. ; Vernet P. & Dufaure J.-P., 1998. The PEA3 protein of the Ets oncogene family is a putative transcriptional modulator of the mouse epididymis-specific glutathione peroxidase gene gpx5. *Mol Reprod Dev* **49**, 131-140.

- Du J. ; Cullen J.J. & Buettner G.R., 2012. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta* **1826**, 443-457.
- Ebisch I.M.W. ; Thomas C.M.G. ; Peters W.H.M. ; Braat D.D.M. & Steegers-Theunissen R.P.M., 2007. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update* **13**, 163-174.
- Ellerman D.A. ; Myles D.G. & Primakoff P., 2006. A Role for Sperm Surface Protein Disulfide Isomerase Activity in Gamete Fusion: Evidence for the Participation of ERp57. *Dev Cell* **10**, 831-837.
- Eltsov M. ; Maclellan K.M. ; Maeshima K. ; Frangakis A.S. & Dubochet J., 2008. Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 19732-19737.
- Evans H.M. & Bishop K.S., 1922. On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. *Science* **56**, 650-651.
- Evenson D. ; Darzynkiewicz Z. ; Jost L. ; Janca F. & Ballachey B., 1986. Changes in accessibility of DNA to various fluorochromes during spermatogenesis. *Cytometry* **7**, 45-53.
- Evenson D.P. & Wixon R., 2008. Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatin Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy outcome. *Fertil Steril* **90**, 1229-1231.
- Evenson D.P. ; Baer R.K. & Jost L.K., 1989. Flow cytometric analysis of rodent epididymal spermatozoal chromatin condensation and loss of free sulphydryl groups. *Mol Reprod Dev* **1**, 283-288.
- Ewen K.A. & Koopman P., 2010. Mouse germ cell development: from specification to sex determination. *Mol Cell Endocrinol* **323**, 76-93.
- Fernández J.L. ; Muriel L. ; Rivero M.T. ; Goyanes V. ; Vazquez R. & Alvarez J.G., 2003. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *J Androl* **24**, 59-66.
- Fernandez-Capetillo O. ; Mahadevaiah S.K. ; Celeste A. ; Romanienko P.J. ; Camerini-Otero R.D. ; Bonner W.M. ; Manova K. ; Burgoyne P. & Nussenzweig A., 2003. H2AX Is Required for Chromatin Remodeling and Inactivation of Sex Chromosomes in Male Mouse Meiosis. *Dev Cell* **4**, 497-508.
- Feuer S.K. ; Camarano L. & Rinaudo P.F., 2013. ART and health: clinical outcomes and insights on molecular mechanisms from rodent studies. *Mol Hum Reprod* **19**, 189-204.
- Fuller W. ; Forsyth T. & Mahendrasingam A., 2004. Water-DNA interactions as studied by X-ray and neutron fibre diffraction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**, 1237-1247; discussion 1247-1248.
- Fussner E. ; Ching R.W. & Bazett-Jones D.P., 2011. Living without 30nm chromatin fibers. *Trends Biochem Sci* **36**, 1-6.
- Garrido N. ; Meseguer M. ; Alvarez J. ; Simón C. ; Pellicer A. & Remohí J., 2004. Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertil Steril* **82**, Supplement 3, 1059-1066.
- Gehring M. ; Reik W. & Henikoff S., 2009. DNA demethylation by DNA repair. *Trends Genet* **25**, 82-90.

- Girouard J. ; Frenette G. & Sullivan R., 2011. Comparative proteome and lipid profiles of bovine epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the caput and cauda epididymidis. *Int J Androl* **34**, e475-e486.
- Gluch A. ; Vidakovic M. & Bode J., 2008. Scaffold/Matrix Attachment Regions (S/MARs): Relevance for Disease and Therapy ; Dans : Klussmann D.E. & Scott J. (Ed.), *Protein-Protein Interactions as New Drug Targets*, Collection Handbook of Experimental Pharmacology. Springer Berlin Heidelberg, p. 67-103.
- Golan R. ; Cooper T.G. ; Oschry Y. ; Oberpenning F. ; Schulze H. ; Shochat L. & Lewin L.M., 1996. Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Hum Reprod* **11**, 1457-1462.
- Goll M.G. ; Kirpekar F. ; Maggert K.A. ; Yoder J.A. ; Hsieh C.-L. ; Zhang X. ; Golic K.G. ; Jacobsen S.E. & Bestor T.H., 2006. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* **311**, 395-398.
- Gomez ; Irvine & Aitken, 1998. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl* **21**, 81-94.
- Govin J. ; Caron C. ; Lestrat C. ; Rousseaux S. & Khochbin S., 2004. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* **271**, 3459-3469.
- Grigoryev S.A. ; Arya G. ; Correll S. ; Woodcock C.L. & Schlick T., 2009. Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *PNAS* **106**, 13317-13322.
- Gupta N.P. & Kumar R., 2002. Lycopene therapy in idiopathic male infertility – a preliminary report. *Int Urol Nephrol* **34**, 369-372.
- Gurley L.R. ; D'anna J.A. ; Barham S.S. ; Deaven L.L. & Tobey R.A., 1978. Histone Phosphorylation and Chromatin Structure during Mitosis in Chinese Hamster Cells. *Eur J Biochem* **84**, 1-15.
- Guse A. ; Carroll C.W. ; Moree B. ; Fuller C.J. & Straight A.F., 2011. In vitro centromere and kinetochore assembly on defined chromatin templates. *Nature* **477**, 354-358.
- Guyonnet B. ; Dacheux F. ; Dacheux J.-L. & Gatti J.-L., 2011. The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. *J Androl* **32**, 651-664.
- Haan J.B. de ; Bladier C. ; Griffiths P. ; Kelner M. ; O'Shea R.D. ; Cheung N.S. ; Bronson R.T. ; Silvestro M.J. ; Wild S. ; Zheng S.S. ; Beart P.M. ; Hertzog P.J. & Kola I., 1998. Mice with a Homozygous Null Mutation for the Most Abundant Glutathione Peroxidase, Gpx1, Show Increased Susceptibility to the Oxidative Stress-inducing Agents Paraquat and Hydrogen Peroxide. *J Biol Chem* **273**, 22528-22536.
- Hammoud S.S. ; Nix D.A. ; Hammoud A.O. ; Gibson M. ; Cairns B.R. & Carrell D.T., 2011. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod* **26**, 2558-2569.
- Hammoud S.S. ; Nix D.A. ; Zhang H. ; Purwar J. ; Carrell D.T. & Cairns B.R., 2009. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* **460**, 473-478.
- Han G. ; Li J. ; Wang Y. ; Li X. ; Mao H. ; Liu Y. & Chen C.D., 2012. The hydroxylation activity of Jmjd6 is required for its homo-oligomerization. *J Cell Biochem* **113**, 1663-1670.

- Hata K. ; Okano M. ; Lei H. & Li E., 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**, 1983-1993.
- Hayes J.D. ; Flanagan J.U. & Jowsey I.R., 2005. Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 51-88.
- Hermann A. ; Gowher H. & Jeltsch A., 2004. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2571-2587.
- Hermann A. ; Schmitt S. & Jeltsch A., 2003. The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem* **278**, 31717-31721.
- Hermo L. & Robaire B., 2002. Epididymal cell types and their functions ; Dans : *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. Kluwer Academic/Plenum, p. 81-102.
- Hirota K. ; Matsui M. ; Iwata S. ; Nishiyama A. ; Mori K. & Yodoi J., 1997. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *PNAS* **94**, 3633-3638.
- Hiura H. ; Sugawara A. ; Ogawa H. ; John R.M. ; Miyauchi N. ; Miyanari Y. ; Horiike T. ; Li Y. ; Yaegashi N. ; Sasaki H. ; Kono T. & Arima T., 2010. A tripartite paternally methylated region within the Gpr1-Zdbf2 imprinted domain on mouse chromosome 1 identified by meDIP-on-chip. *Nucl Acids Res* **38**, 4929-4945.
- Holstein A.-F., 1994. Männliche Geschlechtsorgane ; Dans : Graumann W., Holstein A.-F., Sasse D. *et al.* (Éd.), *Taschenbuch der Anatomie. Innere Organe, Kreislaufsystem, Abwehrsyst.* Elsevier, München, Stuttgart, p. 714.
- Howman E.V. ; Fowler K.J. ; Newson A.J. ; Redward S. ; MacDonald A.C. ; Kalitsis P. & Choo K.H.A., 2000. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *PNAS* **97**, 1148-1153.
- Hsieh Y.-Y. ; Sun Y.-L. ; Chang C.-C. ; Lee Y.-S. ; Tsai H.-D. & Lin C.-S., 2002. Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. *J Clin Lab Anal* **16**, 127-131.
- Ikawa M. ; Inoue N. ; Benham A.M. & Okabe M., 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest* **120**, 984-994.
- Imai H. ; Hakkaku N. ; Iwamoto R. ; Suzuki J. ; Suzuki T. ; Tajima Y. ; Konishi K. ; Minami S. ; Ichinose S. ; Ishizaka K. ; Shioda S. ; Arata S. ; Nishimura M. ; Naito S. & Nakagawa Y., 2009. Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice. *J Biol Chem* **284**, 32522-32532.
- Imai H. ; Suzuki K. ; Ishizaka K. ; Ichinose S. ; Oshima H. ; Okayasu I. ; Emoto K. ; Umeda M. & Nakagawa Y., 2001. Failure of the Expression of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in the Spermatozoa of Human Infertile Males. *Biol Reprod* **64**, 674-683.
- Ito S. ; D'Alessio A.C. ; Taranova O.V. ; Hong K. ; Sowers L.C. & Zhang Y., 2010. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**, 1129-1133.
- Iuchi Y. ; Okada F. ; Tsunoda S. ; Kibe N. ; Shirasawa N. ; Ikawa M. ; Okabe M. ; Ikeda Y. & Fujii J., 2009. Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress. *Biochem J* **419**, 149.
- Jena N.R., 2012. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci* **37**, 503-517.

- Jerzmanowski A., 2007. SWI/SNF chromatin remodeling and linker histones in plants. *Biochim Biophys Acta* **1769**, 330-345.
- Jeulin C. ; Soufir J.C. ; Weber P. ; Laval-Martin D. & Calvayrac R., 1989. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res* **24**, 185-196.
- Jin R.C. ; Mahoney C.E. ; Anderson L. (Coleman) ; Ottaviano F. ; Croce K. ; Leopold J.A. ; Zhang Y.-Y. ; Tang S.-S. ; Handy D.E. & Loscalzo J., 2011. Glutathione Peroxidase-3 Deficiency Promotes Platelet-Dependent Thrombosis In Vivo Clinical Perspective. *Circulation* **123**, 1963-1973.
- Johnson G.D. ; Lalancette C. ; Linnemann A.K. ; Leduc F. ; Boissonneault G. & Krawetz S.A., 2011. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction* **141**, 21-36.
- Johnston D.S. ; Jelinsky S.A. ; Bang H.J. ; DiCandeloro P. ; Wilson E. ; Kopf G.S. & Turner T.T., 2005. The Mouse Epididymal Transcriptome: Transcriptional Profiling of Segmental Gene Expression in the Epididymis. *Biol Reprod* **73**, 404-413.
- Joshi R. ; Adhikari S. ; Patro B.S. ; Chattopadhyay S. & Mukherjee T., 2001. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* **30**, 1390-1399.
- Jungwirth A. ; Giwercman A. ; Tournaye H. ; Diemer T. ; Kopa Z. ; Dohle G. & Krausz C., 2012. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility: The 2012 Update. *Eur Urol* **62**, 324-332.
- Kameshwari D.B. ; Bhande S. ; Sundaram C.S. ; Kota V. ; Siva A.B. & Shivaji S., 2010. Glucose-regulated protein precursor (GRP78) and tumor rejection antigen (GP96) are unique to hamster caput epididymal spermatozoa. *Asian J Androl* **12**, 344-355.
- Karytinis A. ; Forneris F. ; Profumo A. ; Ciossani G. ; Battaglioli E. ; Binda C. & Mattevi A., 2009. A Novel Mammalian Flavin-dependent Histone Demethylase. *J Biol Chem* **284**, 17775-17782.
- Knapen M.F.C.. ; Zusterzeel P.L.. ; Peters W.H.. & Steegers E.A., 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **82**, 171-184.
- Kobayashi H. ; Yamada K. ; Morita S. ; Hiura H. ; Fukuda A. ; Kagami M. ; Ogata T. ; Hata K. ; Sotomaru Y. & Kono T., 2009. Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene Zdbf2 on chromosome 1 and its imprinted human homolog ZDBF2 on chromosome 2. *Genomics* **93**, 461-472.
- Kolasa A. ; Marchlewicz M. ; Adler G. ; Ciechanowicz A. ; Głabowski W. & Wiszniewska B., 2008. Expression of E-SOD, GPX5 mRNAs and immunoexpression of Cu/ZnSOD in epididymal epithelial cells of finasteride-treated rats. *Andrologia* **40**, 303-311.
- Kryukov G.V. ; Castellano S. ; Novoselov S.V. ; Lobanov A.V. ; Zehtab O. ; Guigó R. & Gladyshev V.N., 2003. Characterization of Mammalian Selenoproteomes. *Science* **300**, 1439-1443.
- Krzanowska H., 1982. Toluidine blue staining reveals changes in chromatin stabilization of mouse spermatozoa during epididymal maturation and penetration of ova. *J Reprod Fertil* **64**, 97-101.
- Kuhlmann M. ; Borisova B.E. ; Kaller M. ; Larsson P. ; Stach D. ; Na J. ; Eichinger L. ; Lyko F. ; Ambros V. ; Söderbom F. ; Hammann C. & Nellen W., 2005. Silencing of retrotransposons in Dictyostelium by DNA methylation and RNAi. *Nucl Acids Res* **33**, 6405-6417.

- Kunert N. ; Marhold J. ; Stanke J. ; Stach D. & Lyko F., 2003. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* **130**, 5083-5090.
- Kurtz K. ; Saperas N. ; Ausió J. & Chiva M., 2009. Spermiogenic nuclear protein transitions and chromatin condensation. Proposal for an ancestral model of nuclear spermiogenesis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **312B**, 149-163.
- La Salle S. & Trasler J.M., 2006. Epigenetic patterning in male germ cells: importance of DNA methylation to progeny outcome ; Dans : *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge, UK ; New York, USA, p. 279-322.
- Lee K.-K. ; Murakawa M. ; Takahashi S. ; Tsubuki S. ; Kawashima S. ; Sakamaki K. & Yonehara S., 1998. Purification, Molecular Cloning, and Characterization of TRP32, a Novel Thioredoxin-related Mammalian Protein of 32 kDa. *J Biol Chem* **273**, 19160-19166.
- Lei X.G. & Cheng W.-H., 2005. New Roles for an Old Selenoenzyme: Evidence from Glutathione Peroxidase-1 Null and Overexpressing Mice. *J Nutr* **135**, 2295-2298.
- Lévesque D. ; Veilleux S. ; Caron N. & Boissonneault G., 1998. Architectural DNA-Binding Properties of the Spermatidal Transition Proteins 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* **252**, 602-609.
- Lewis S.E.M. & Aitken R.J., 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* **322**, 33-41.
- Li A. ; Maffey A.H. ; Abbott W.D. ; Conde e Silva N. ; Prunell A. ; Siino J. ; Churikov D. ; Zalensky A.O. & Ausió J., 2005. Characterization of Nucleosomes Consisting of the Human Testis/Sperm-Specific Histone H2B Variant (hTSH2B). *Biochemistry* **44**, 2529-2535.
- Li Y. ; Lalancette C. ; Miller D. & Krawetz S.A., 2008. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J Androl* **10**, 535-541.
- Listowsky I. ; Rowe J.D. ; Patskovsky Y.V. ; Tchaikovskaya T. ; Shintani N. ; Novikova E. & Nieves E., 1998. Human testicular glutathione S-transferases: insights into tissue-specific expression of the diverse subunit classes. *Chem Biol Interact* **111-112**, 103-112.
- Liu K. ; Wang Y.F. ; Cantemir C. & Muller M.T., 2003. Endogenous assays of DNA methyltransferases: Evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo. *Mol Cell Biol* **23**, 2709-2719.
- Lombardo F. ; Sansone A. ; Romanelli F. ; Paoli D. ; Gandini L. & Lenzi A., 2011. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: an overview. *Asian J Androl* **13**, 690-697.
- Luger K. ; Mäder A.W. ; Richmond R.K. ; Sargent D.F. & Richmond T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- Lushchak V.I., 2007. Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. *Biochemistry (Mosc.)* **72**, 809-827.
- Maeshima K. ; Hihara S. & Eltsov M., 2010. Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr Opin Cell Biol* **22**, 291-297.
- Maiorino M. ; Roveri A. ; Benazzi L. ; Bosello V. ; Mauri P. ; Toppo S. ; Tosatto S.C.E. & Ursini F., 2005. Functional Interaction of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase with Sperm Mitochondrion-associated Cysteine-rich Protein Discloses the Adjacent Cysteine Motif as a New Substrate of the Selenoperoxidase. *J Biol Chem* **280**, 38395-38402.

- Manandhar G. ; Miranda-Vizuete A. ; Pedrajas J.R. ; Krause W.J. ; Zimmerman S. ; Sutovsky M. & Sutovsky P., 2009. Peroxiredoxin 2 and Peroxidase Enzymatic Activity of Mammalian Spermatozoa. *Biol Reprod* **80**, 1168-1177.
- Martínez-García F. ; Regadera J. ; Cobo P. ; Palacios J. ; Paniagua R. & Nistal M., 1995. The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia* **27**, 195-206.
- Martins M.R.F.B. & Silva J.R.C.P., 2001. Ultrastructure of Spermatogonia and Primary Spermatocytes of C57BL6J Mice. *Anat Histol Embryol* **30**, 129-132.
- Martins R.P. ; Ostermeier G.C. & Krawetz S.A., 2004. Nuclear Matrix Interactions at the Human Protamine Domain: a working model of potentiation. *J Biol Chem* **279**, 51862-51868.
- Melis J.P.M. ; van Steeg H. & Luijten M., 2012. Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. *Antioxid Redox Signal*.
- Meyers S.A., 2012. Cryostorage and Oxidative Stress in Mammalian Spermatozoa ; Dans : Agarwal A., Aitken R.J., & Alvarez J.G. (Éd.), *Studies on Men's Health and Fertility*, Collection Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Humana Press (Springer), New York, Dordrecht, Heidelberg, London, p. 41-56.
- Millan N.M. ; Lau P. ; Hann M. ; Ioannou D. ; Hoffman D. ; Barrionuevo M. ; Maxson W. ; Ory S. & Tempest H.G., 2012. Hierarchical radial and polar organisation of chromosomes in human sperm. *Chromosome Res* **20**, 875-887.
- Miyamoto S. ; Kawano H. ; Hokamaki J. ; Soejima H. ; Kojima S. ; Kudoh T. ; Nagayoshi Y. ; Sugiyama S. ; Sakamoto T. ; Yoshimura M. ; Nakamura H. ; Yodoi J. & Ogawa H., 2005. Increased Plasma Levels of Thioredoxin in Patients with Glucose Intolerance. *Intern Med* **44**, 1127-1132.
- Mruk D.D. ; Silvestrini B. ; Mo M. & Cheng C.Y., 2002. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* **65**, 305-311.
- Mudrak O. ; Tomilin N. & Zalensky A., 2005. Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *J Cell Sci* **118**, 4541-4550.
- Mudrak O.S. ; B. Nazarov I. ; Jones E.L. & Zalensky A.O., 2012. Positioning of Chromosomes in Human Spermatozoa Is Determined by Ordered Centromere Arrangement. *PLoS ONE* **7**, e52944.
- Murawski M. ; Saczko J. ; Marcinkowska A. ; Chwilkowska A. ; Gryboś M. & Banaś T., 2007. Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. *Folia Histochem Cytobiol* **45 Suppl 1**, S123-126.
- Muriel L. ; Garrido N. ; Fernández J.L. ; Remohí J. ; Pellicer A. ; de los Santos M.J. & Meseguer M., 2006. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* **85**, 371-383.
- Murr R. ; Loizou J.I. ; Yang Y.-G. ; Cuenin C. ; Li H. ; Wang Z.-Q. & Herceg Z., 2006. Histone acetylation by Trapp-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* **8**, 91-99.
- Nadel B. ; Lara J. de ; Finkernagel S.W. & Ward W.S., 1995. Cell-specific organization of the 5S ribosomal RNA gene cluster DNA loop domains in spermatozoa and somatic cells. *Biol Reprod* **53**, 1222-1228.

- Nakano S. ; Yamaguchi D. ; Tateishi-Karimata H. ; Miyoshi D. & Sugimoto N., 2012. Hydration Changes upon DNA Folding Studied by Osmotic Stress Experiments. *Biophys J* **102**, 2808-2817.
- Nguyen V.D. ; Saaranen M.J. ; Karala A.-R. ; Lappi A.-K. ; Wang L. ; Raykhel I.B. ; Alanen H.I. ; Salo K.E.H. ; Wang C. & Ruddock L.W., 2011. Two Endoplasmic Reticulum PDI Peroxidases Increase the Efficiency of the Use of Peroxide during Disulfide Bond Formation. *J Mol Biol* **406**, 503-515.
- Nickerson J.A. ; Krockmalnic G. ; Wan K.M. & Penman S., 1997. The nuclear matrix revealed by eluting chromatin from a cross-linked nucleus. *PNAS* **94**, 4446-4450.
- Noblanc A. ; Peltier M. ; Damon-Soubeyrand C. ; Kerchkove N. ; Chabory E. ; Vernet P. ; Saez F. ; Cadet R. ; Janny L. ; Pons-Rejraji H. ; Conrad M. ; Drevet J.R. & Kocer A., 2012. Epididymis Response Partly Compensates for Spermatozoa Oxidative Defects in snGPx4 and GPx5 Double Mutant Mice. *PLoS ONE* **7**, e38565.
- Nordberg J. & Arnér E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* **31**, 1287-1312.
- Nowak S.J. & Corces V.G., 2000. Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. *Genes Dev* **14**, 3003-3013.
- O'Donnell L. ; Nicholls P.K. ; O'Bryan M.K. ; McLachlan R.I. & Stanton P.G., 2011. Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis* **1**, 14-35.
- O'Flaherty C. & Souza A.R. de, 2011. Hydrogen Peroxide Modifies Human Sperm Peroxiredoxins in a Dose-Dependent Manner. *Biol Reprod* **84**, 238-247.
- Ochsendorf F.R. ; Buhl R. ; Bästlein A. & Beschmann H., 1998. Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. *Hum Reprod* **13**, 353-359.
- Okano M. ; Bell D.W. ; Haber D.A. & Li E., 1999. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* **99**, 247-257.
- Okano M. ; Xie S. & Li E., 1998. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **26**, 2536-2540.
- Olins D.E. & Olins A.L., 2003. Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 809-814.
- Olshan A.F. ; Luben T.J. ; Hanley N.M. ; Perreault S.D. ; Chan R.L. ; Herring A.H. ; Basta P.V. & DeMarini D.M., 2010. Preliminary examination of polymorphisms of GSTM1, GSTT1, and GSTZ1 in relation to semen quality. *Mutat Res* **688**, 41-46.
- Olson G.E. ; Winfrey V.P. & Nagdas S.K., 2003. Structural modification of the hamster sperm acrosome during posttesticular development in the epididymis. *Microsc Res Tech* **61**, 46-55.
- Onorato T.M. ; Brown P.W. & Morris P.L., 2008. Mono-(2-ethylhexyl) Phthalate Increases Spermatoocyte Mitochondrial Peroxiredoxin 3 and Cyclooxygenase 2. *J Androl* **29**, 293-303.
- Oteiza P.I., 2012. Zinc and the modulation of redox homeostasis. *Free Radic Biol Med* **53**, 1748-1759.
- Page J. ; Fuente R. ; Manterola M. ; Parra M.T. ; Viera A. ; Berríos S. ; Fernández-Donoso R. & Rufas J.S., 2012. Inactivation or non-reactivation: what accounts better for the silence of sex chromosomes during mammalian male meiosis? *Chromosoma* **121**, 307-326.
- Palozza P. ; Catalano A. ; Simone R. & Cittadini A., 2012. Lycopene as a guardian of redox signalling. *Acta Biochim Pol* **59**, 21-25.

- Pawlowski W.P. & Cande W.Z., 2005. Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends Cell Biol* **15**, 674-681.
- Pfeifer H. ; Conrad M. ; Roethlein D. ; Kyriakopoulos A. ; Brielmeier M. ; Bornkamm G.W. & Behne D., 2001. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J*.
- Phalke S. ; Nickel O. ; Walluscheck D. ; Hortig F. ; Onorati M.C. & Reuter G., 2009. Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of *Drosophila* depends on the cytosine-5 methyltransferase DNMT2. *Nat Genet* **41**, 696-702.
- Pipolo S. ; Puglisi R. ; Sodano I. ; Nusca S. ; Mangia F. & Boitani C., 2012. Impact of the Slenoprotein nGPx4 on Male Fertility and Sperm Epigenome ; Dans : *Journal Für Reproduktionsmedizin Und Endokrinologie*. Présenté à 7th European Congress of Andrology (ECA) 2012, European Academy of Andrology/EAU Section of Andrological Urology/German Society of Andrology, Berlin, p. 330-331.
- Pivot-Pajot C. ; Caron C. ; Govin J. ; Vion A. ; Rousseaux S. & Khochbin S., 2003. Acetylation-Dependent Chromatin Reorganization by BRDT, a Testis-Specific Bromodomain-Containing Protein. *Mol Cell Biol* **23**, 5354-5365.
- Portela A. & Esteller M., 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* **28**, 1057-1068.
- Pray L.A., 2008. Eukaryotic genome complexity. *Nature Education* **1**.
- Puglisi R. ; Maccari I. ; Pipolo S. ; Conrad M. ; Mangia F. & Boitani C., 2012. The nuclear form of Glutathione Peroxidase 4 is associated with sperm nuclear matrix and is required for proper paternal chromatin decondensation at fertilization. *J Cell Physiol* **227**, 1420-1427.
- Raijmakers M.T.. ; Roelofs H.M.. ; Steegers E.A.. ; Steegers-Theunissen R. égin. P.. ; Mulder T.P.. ; Knapen M.F.C.. ; Wong W.Y. & Peters W.H., 2003. Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. *Fertil Steril* **79**, 169-172.
- Ramya T. ; Misro M.M. ; Sinha D. ; Nandan D. & Mithal S., 2011. Altered levels of seminal nitric oxide, nitric oxide synthase, and enzymatic antioxidants and their association with sperm function in infertile subjects. *Fertil Steril* **95**, 135-140.
- Rao A.V. & Shaha C., 2000. Role of glutathione S-transferases in oxidative stress-induced male germ cell apoptosis. *Free Radic Biol Med* **29**, 1015-1027.
- Rejraji H. ; Vernet P. & Drevet J.R., 2002. GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol Reprod Dev* **63**, 96-103.
- Rhee S.G. & Woo H.A., 2011. Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. *Antioxid Redox Signal* **15**, 781-794.
- Robinson P.J.J. ; Fairall L. ; Huynh V.A.T. & Rhodes D., 2006. EM measurements define the dimensions of the « 30-nm » chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure. *PNAS* **103**, 6506-6511.
- Roest H.. ; van Klaveren J. ; de Wit J. ; van Gurp C.. ; Koken M.H.. ; Vermey M. ; van Rooijen J.. ; Hoogerbrugge J.. ; Vreeburg J.T.. ; Baarends W.. ; Bootsma D. ; Grootegeod J.. & Hoeijmakers J.H., 1996. Inactivation of the HR23B Ubiquitin-Conjugating DNA Repair Enzyme in Mice Causes Male Sterility Associated with Chromatin Modification. *Cell* **86**, 799-810.

- Rosato M.P. ; Di Iorio M. ; Manchisi A. ; Gambacorta M. ; Petrosino G. ; Centoducati G. ; Santacroce M.P. & Iaffaldano N., 2012. In vitro survival and lipid peroxidation status of rabbit spermatozoa after both chilled and frozen storage in lycopene enriched extenders. *Livest Sci* **146**, 199-202.
- Ross C. ; Morriss A. ; Khairy M. ; Khalaf Y. ; Braude P. ; Coomarasamy A. & El-Toukhy T., 2010. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod BioMed Online* **20**, 711-723.
- Rothbart S.B. ; Krajewski K. ; Nady N. ; Tempel W. ; Xue S. ; Badeaux A.I. ; Barsyte-Lovejoy D. ; Martinez J.Y. ; Bedford M.T. ; Fuchs S.M. ; Arrowsmith C.H. & Strahl B.D., 2012. Association of UHRF1 with methylated H3K9 directs the maintenance of DNA methylation. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 1155-1160.
- Rouas C. & Gueguen Y., 2011. Le système de détoxification des xénobiotiques est-il affecté par une exposition chronique à l'uranium ?
- Rowley M.J. ; Berlin J.D. & Heller C.G., 1971. The ultrastructure of four types of human spermatogonia. *Z Zellforsch* **112**, 139-157.
- Rubartelli A. ; Bajetto A. ; Allavena G. ; Wollman E. & Sitia R., 1992. Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J Biol Chem* **267**, 24161-24164.
- Sadava D. ; Heller H.C. ; Orians G.H. ; Purves W.K. & Hillis D., 2008. Life: The Science of Biology. Sinauer Associates.
- Saez F. ; Ouvrier A. & Drevet J.R., 2011. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian J Androl* **13**, 11-17.
- Sakabe K. ; Wang Z. & Hart G.W., 2010. β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *PNAS* **107**, 19915-19920.
- Sanders S.L. ; Portoso M. ; Mata J. ; Bähler J. ; Allshire R.C. & Kouzarides T., 2004. Methylation of Histone H4 Lysine 20 Controls Recruitment of Crb2 to Sites of DNA Damage. *Cell* **119**, 603-614.
- Sarg B. ; Chwatal S. ; Talasz H. & Lindner H.H., 2009. Testis-specific linker histone H1t is multiply phosphorylated during spermatogenesis. Identification of phosphorylation sites. *J Biol Chem* **284**, 3610-3618.
- Sasagawa I. ; Matsuki S. ; Suzuki Y. ; Iuchi Y. ; Tohya K. ; Kimura M. ; Nakada T. & Fujii J., 2001. Possible involvement of the membrane-bound form of peroxiredoxin 4 in acrosome formation during spermiogenesis of rats. *Eur J Biochem* **268**, 3053-3061.
- Sasaki H. & Matsui Y., 2008. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* **9**, 129-140.
- Sawyer D.E. ; Mercer B.G. ; Wiklendt A.M. & Aitken R.J., 2003. Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutat Res* **529**, 21-34.
- Scarlett C.J. ; Lin M. & Aitken R.J., 2001. Actin polymerisation during morphogenesis of the acrosome as spermatozoa undergo epididymal maturation in the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *J Anat* **198**, 93-101.
- Schaefer M. ; Pollex T. ; Hanna K. ; Tuorto F. ; Meusburger M. ; Helm M. & Lyko F., 2010. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev* **24**, 1590-1595.

- Schalch T. ; Duda S. ; Sargent D.F. & Richmond T.J., 2005. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* **436**, 138-141.
- Schneider B. ; Patel K. & Berman H.M., 1998. Hydration of the Phosphate Group in Double-Helical DNA. *Biophys J* **75**, 2422-2434.
- Schneider M. ; Förster H. ; Boersma A. ; Seiler A. ; Wehnes H. ; Sinowatz F. ; Neumüller C. ; Deutsch M.J. ; Walch A. ; Angelis M.H. de ; Wurst W. ; Ursini F. ; Roveri A. ; Maleszewski M. ; Maiorino M. & Conrad M., 2009. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J* **23**, 3233-3242.
- Schwaab V. ; Lareyre J.J. ; Vernet P. ; Pons E. ; Faure J. ; Dufaure J.P. & Drevet J.R., 1998. Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* **53**, 157-162.
- Shaha C. ; Suri A. & Talwar G.P., 1988. Identification of sperm antigens that regulate fertility. *Int J Androl* **11**, 479-491.
- Shalgi R. ; Seligman J. & Kosower N.S., 1989. Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biol Reprod* **40**, 1037-1045.
- Shaman J.A. ; Yamauchi Y. & Ward W.S., 2007a. Function of the sperm nuclear matrix. *Arch Androl* **53**, 135-140.
- Shamsi M.B. ; Venkatesh S. ; Kumar R. ; Gupta N.P. ; Malhotra N. ; Singh N. ; Mittal S. ; Arora S. ; Arya D.S. ; Talwar P. ; Sharma R.K. & Dada R., 2010. Antioxidant levels in blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men. *Indian J Biochem Biophys* **47**, 38-43.
- Shang E. ; Nickerson H.D. ; Wen D. ; Wang X. & Wolgemuth D.J., 2007. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* **134**, 3507-3515.
- Sharif J. ; Muto M. ; Takebayashi S. ; Suetake I. ; Iwamatsu A. ; Endo T.A. ; Shinga J. ; Mizutani-Koseki Y. ; Toyoda T. ; Okamura K. ; Tajima S. ; Mitsuya K. ; Okano M. & Koseki H., 2007. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* **450**, 908-912.
- Sharma R. ; Yang Y. ; Sharma A. ; Awasthi S. & Awasthi Y.C., 2004. Antioxidant Role of Glutathione S-Transferases: Protection Against Oxidant Toxicity and Regulation of Stress-Mediated Apoptosis. *Antioxid Redox Signal* **6**, 289-300.
- Shi Y. ; Lan F. ; Matson C. ; Mulligan P. ; Whetstine J.R. ; Cole P.A. ; Casero R.A. & Shi Y., 2004. Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-953.
- Shirley C.R. ; Hayashi S. ; Mounsey S. ; Yanagimachi R. & Meistrich M.L., 2004. Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol Reprod* **71**, 1220-1229.
- Shum W.W.C. ; Da Silva N. ; McKee M. ; Smith P.J.S. ; Brown D. & Breton S., 2008. Transepithelial Projections from Basal Cells Are Luminal Sensors in Pseudostratified Epithelia. *Cell* **135**, 1108-1117.
- Silva P.F.N., 2006. Physiology of peroxidation precesses in mammalian sperm (Thèse de Doctorat).

- Simonin H. ; Beney L. & Gervais P., 2007. Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1600-1610.
- Singleton S. ; Zalensky A. ; Doncel G.F. ; Morshedi M. & Zalenskaya I.A., 2007. Testis/sperm-specific histone 2B in the sperm of donors and subfertile patients: variability and relation to chromatin packaging. *Hum Reprod* **22**, 743-750.
- Smallwood S.A. & Kelsey G., 2012. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet* **28**, 33-42.
- Sotolongo B. ; Huang T.T.F. ; Isenberger E. & Ward W.S., 2005. An Endogenous Nuclease in Hamster, Mouse, and Human Spermatozoa Cleaves DNA into Loop-Sized Fragments. *J Androl* **26**, 272-280.
- Sotolongo B. ; Lino E. & Ward W.S., 2003. Ability of Hamster Spermatozoa to Digest Their Own DNA. *Biol Reprod* **69**, 2029-2035.
- Staveley B.E., 2013. Vertebrate Development I: Life Cycles and Experimental Techniques [WWW Document]. *Molecular & Developmental Biology*. URL http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/devo_03.html
- Stein K.K. ; Go J.C. ; Lane W.S. ; Primakoff P. & Myles D.G., 2006. Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions. *Proteomics* **6**, 3533-3543.
- Suleiman S.A. ; Ali M.E. ; Zaki Z.M. ; el-Malik E.M. & Nasr M.A., 1996. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* **17**, 530-537.
- Sullivan K.F. ; Hechenberger M. & Masri K., 1994. Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J Cell Biol* **127**, 581-592.
- Tahiliani M. ; Koh K.P. ; Shen Y. ; Pastor W.A. ; Bandukwala H. ; Brudno Y. ; Agarwal S. ; Iyer L.M. ; Liu D.R. ; Aravind L. & Rao A., 2009. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* **324**, 930-935.
- Tan M. ; Luo H. ; Lee S. ; Jin F. ; Yang J.S. ; Montellier E. ; Buchou T. ; Cheng Z. ; Rousseaux S. ; Rajagopal N. ; Lu Z. ; Ye Z. ; Zhu Q. ; Wysocka J. ; Ye Y. ; Khochbin S. ; Ren B. & Zhao Y., 2011. Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a New Type of Histone Modification. *Cell* **146**, 1016-1028.
- Tanphaichitr N. ; Sobhon P. ; Taluppeth N. & Chalermisarachai P., 1978. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* **117**, 347-356.
- Thiagarajan D. ; Dev R.R. & Khosla S., 2011. The DNA methyltransferase Dnmt2 participates in RNA processing during cellular stress. *Epigenetics* **6**, 103-113.
- Thimon V. ; Frenette G. ; Saez F. ; Thabet M. & Sullivan R., 2008. Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Hum Reprod* **23**, 1698-1707.
- Tkaczuk-Wlach J. ; Kankofer M. & Jakiel G., 2002. Activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in human semen in normozoospermia and spermatopathy. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med* **57**, 369-375.
- Tomonaga T. ; Matsushita K. ; Yamaguchi S. ; Oohashi T. ; Shimada H. ; Ochiai T. ; Yoda K. & Nomura F., 2003. Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Res* **63**, 3511-3516.

- Toppo S. ; Flohé L. ; Ursini F. ; Vanin S. & Maiorino M., 2009. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta* **1790**, 1486-1500.
- Traber M.G. & Atkinson J., 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* **43**, 4-15.
- Turner J.M.A. ; Aprelikova O. ; Xu X. ; Wang R. ; Kim S. ; Chandramouli G.V.R. ; Barrett J.C. ; Burgoyne P.S. & Deng C.-X., 2004. BRCA1, Histone H2AX Phosphorylation, and Male Meiotic Sex Chromosome Inactivation. *Curr Biol* **14**, 2135-2142.
- Unoki M. ; Nishidate T. & Nakamura Y., 2004. ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene* **23**, 7601-7610.
- Ursini F. ; Heim S. ; Kiess M. ; Maiorino M. ; Roveri A. ; Wissing J. & Flohé L., 1999. Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation. *Science* **285**, 1393-1396.
- Uysal O. & Bucak M.N., 2007. Effects of Oxidized Glutathione, Bovine Serum Albumin, Cysteine and Lycopene on the Quality of Frozen-Thawed Ram Semen. *Acta Vet Brno* **76**, 383-390.
- Valinluck V. & Sowers L.C., 2007. Endogenous Cytosine Damage Products Alter the Site Selectivity of Human DNA Maintenance Methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* **67**, 946-950.
- Van den Wyngaert I. ; Sprengel J. ; Kass S.U. & Luyten W.H., 1998. Cloning and analysis of a novel human putative DNA methyltransferase. *FEBS Lett* **426**, 283-289.
- Van Holde K. & Zlatanova J., 2007. Chromatin fiber structure: Where is the problem now? *Semin Cell Dev Biol* **18**, 651-658.
- Veri J.P. ; Hermo L. & Robaire B., 1993. Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. *J Androl* **14**, 23-44.
- Vernet P. ; Faure J. ; Dufaure J.P. & Drevet J.R., 1997. Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol. Reprod. Dev.* **47**, 87-98.
- Vernet P. ; Rigaudière N. ; Ghyselinck N. ; Dufaure J.P. & Drevet J.R., 1996. In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochem Cell Biol* **74**, 125-131.
- Vernet P. ; Rock E. ; Mazur A. ; Rayssiguier Y. ; Dufaure J.-P. & Drevet J.R., 1999. Selenium-independent epididymis-restricted glutathione peroxidase 5 protein (GPX5) can back up failing Se-dependent GPXs in mice subjected to selenium deficiency. *Mol Reprod Dev* **54**, 362-370.
- Vitali G. ; Parente R. & Melotti C., 1995. Carnitine supplementation in human idiopathic asthenospermia: clinical results. *Drugs Exp Clin Res* **21**, 157-159.
- Wang J.C., 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 430-440.
- Ward W.S. & Coffey D.S., 1989. Identification of a Sperm Nuclear Annulus: A Sperm DNA Anchor. *Biol Reprod* **41**, 361-370.
- Ward W.S. ; Partin A.W. & Coffey D.S., 1989. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma* **98**, 153-159.

- Ward W.S., 2010. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* **16**, 30-36.
- Watson P., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* **60-61**, 481-492.
- Wei Y. ; Mizzen C.A. ; Cook R.G. ; Gorovsky M.A. & Allis C.D., 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *PNAS* **95**, 7480-7484.
- Williams S.P. ; Athey B.D. ; Muglia L.J. ; Schappe R.S. ; Gough A.H. & Langmore J.P., 1986. Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length. *Biophys J* **49**, 233-248.
- Wong W.Y. ; Merkus H.M.W. ; Thomas C.M. ; Menkveld R. ; Zielhuis G.A. & Steegers-Theunissen R.P., 2002. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril* **77**, 491-498.
- Woodcock C.L. ; Skoultchi A.I. & Fan Y., 2006. Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res* **14**, 17-25.
- World C. ; Spindel O.N. & Berk B.C., 2011. Thioredoxin-Interacting Protein Mediates TRX1 Translocation to the Plasma Membrane in Response to Tumor Necrosis Factor- α A Key Mechanism for Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Transactivation by Reactive Oxygen Species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 1890-1897.
- Wu Q. ; Qian Y.-M. ; Zhao X.-L. ; Wang S.-M. ; Feng X.-J. ; Chen X.-F. & Zhang S.-H., 2012. Expression and prognostic significance of centromere protein A in human lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* **77**, 407-414.
- Wu Y. ; Yang L. & Zhong L., 2010. Decreased serum levels of thioredoxin in patients with coronary artery disease plus hyperhomocysteinemia is strongly associated with the disease severity. *Atherosclerosis* **212**, 351-355.
- Wysocka J. ; Allis C.D. & Coonrod S., 2006. Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front Biosci* **11**, 344-355.
- Yamamoto Y. ; Verma U.N. ; Prajapati S. ; Kwak Y.-T. & Gaynor R.B., 2003. Histone H3 phosphorylation by IKK- α is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* **423**, 655-659.
- Yant L.J. ; Ran Q. ; Rao L. ; Van Remmen H. ; Shibatani T. ; Belter J.G. ; Motta L. ; Richardson A. & Prolla T.A., 2003. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med* **34**, 496-502.
- Yeung C.H. ; Perez-Sanchez F. ; Soler C. ; Poser D. ; Kliesch S. & Cooper T.G., 1997. Maturation of human spermatozoa (from selected epididymides of prostatic carcinoma patients) with respect to their morphology and ability to undergo the acrosome reaction. *Hum Reprod Update* **3**, 205-213.
- Yoder J.A. & Bestor T.H., 1998. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum Mol Genet* **7**, 279-284.
- Yossefi S. ; Oschry Y. & Lewin L.M., 1994. Chromatin condensation in hamster sperm: A flow cytometric investigation. *Mol Reprod Dev* **37**, 93-98.
- Yu Y.E. ; Zhang Y. ; Unni E. ; Shirley C.R. ; Deng J.M. ; Russell L.D. ; Weil M.M. ; Behringer R.R. & Meistrich M.L., 2000. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4683 -4688.

- Zalenskaya I.A. ; Bradbury E.M. & Zalensky A.O., 2000. Chromatin Structure of Telomere Domain in Human Sperm. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 213-218.
- Zalensky A.O. ; Breneman J.W. ; Zalenskaya I.A. ; Brinkley B.R. & Bradbury E.M., 1993. Organization of centromeres in the decondensed nuclei of mature human sperm. *Chromosoma* **102**, 509-518.
- Zelen I. ; Mitrović M. ; Jurisic-Skevin A. & Arsenijević S., 2010. Activity of superoxide dismutase and catalase and content of malondialdehyde in seminal plasma of infertile patients. *Med Pregl* **63**, 624-629.
- Zhang H. & Forman H.J., 2012. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin Cell Dev Biol* **23**, 722-728.
- Zhang T. ; Chabory E. ; Britan A. ; Grignard E. ; Pitiot O. ; Saez F. ; Cadet R. ; Henry-Berger J. ; Vernet P. & Drevet J.R., 2008. GPX5, the selenium-independent glutathione peroxidase-encoding single copy gene is differentially expressed in mouse epididymis. *Reprod Fertil Dev* **20**, 615-625.
- Zhang Y., 2003. Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev* **17**, 2733-2740.
- Zhao M. ; Shirley C.R. ; Yu Y.E. ; Mohapatra B. ; Zhang Y. ; Unni E. ; Deng J.M. ; Arango N.A. ; Terry N.H.A. ; Weil M.M. ; Russell L.D. ; Behringer R.R. & Meistrich M.L., 2001. Targeted Disruption of the Transition Protein 2 Gene Affects Sperm Chromatin Structure and Reduces Fertility in Mice. *Mol Cell Biol* **21**, 7243-7255.
- Zhao X. ; Tang R. ; Wang M. ; Guo W. ; Liu J. ; Li L. & Xing W., 2013. Distribution of PDIA3 transcript and protein in rat testis and sperm cells. *Reprod Domest Anim* **48**, 59-63.
- Zini A. & Sigman M., 2009. Are Tests of Sperm DNA Damage Clinically Useful? Pros and Cons. *J Androl* **30**, 219-229.
- Zini A. ; Garrels K. & Phang D., 2000. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology* **55**, 922-926.
- Zini A. ; San Gabriel M. & Libman J., 2010. Lycopene supplementation in vitro can protect human sperm deoxyribonucleic acid from oxidative damage. *Fertil Steril* **94**, 1033-1036.
- Zribi N. ; Feki Chakroun N. ; El Euch H. ; Gargouri J. ; Bahloul A. & Ammar Keskes L., 2010. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* **93**, 159-166.

PUBLICATIONS

Publication 1 : Revue bibliographique

Glutathione peroxidases at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability

A. Noblanc, A. Kocer, E. Chabory, P. Vernet, F. Saez, R. Cadet, M. Conrad & JLR. Drevet

Journal of Andrology, 2011, **32** (6) : 641-650.

Glutathione Peroxidases at Work on Epididymal Spermatozoa: An Example of the Dual Effect of Reactive Oxygen Species on Mammalian Male Fertilizing Ability

Review

ANAÏS NOBLANC,* AYHAN KOCER,* ELÉONORE CHABORY,† PATRICK VERNET,* FABRICE SAEZ,* RÉMI CADET,* MARCUS CONRAD,‡§ AND JOËL R. DREVET*

From the *GReD "Genetics, Reproduction and Development" Laboratory, Clermont Université, Aubière, France; the †Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Assistance Médicale à la Procréation, BIOMNIS, Lyon, France; the ‡DZNE—German Center for Neurodegenerative Diseases, Munich, Germany; and the §Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Institute of Developmental Genetics, Neuherberg, Germany.

ABSTRACT: The mammalian glutathione peroxidase (GPx) gene family encodes bifunctional enzymes that can work either as classical reactive oxygen species (ROS) scavengers or as thiol peroxidases, thereby introducing disulfide bridges in thiol-containing proteins. These dual effects are nowhere better demonstrated than in epididymal maturing spermatozoa, where the concomitant actions of several GPx ensure the achievement of the structural maturation of sperm cells as well as their protection against ROS-induced damage. We review here the roles played by the sperm-associated

forms of GPx4 (mitochondrial GPx4 and nuclear GPx4), the secreted GPx5 protein, and the epithelial proteins GPx1, GPx3, and cellular GPx4, all functioning in the mammalian epididymis at different stages of the sperm's epididymal journey, and in different epididymis compartments.

Key words: Hydrogen peroxide, lipid peroxidation, disulfide bridges, protamines, DNA condensation, DNA oxidation, genomic stability.

J Androl 2011;32:641–650

Glutathione peroxidases (GPx; EC 1.11.1.9) belong to the classical catalytic triad of primary enzymatic antioxidant scavengers that any oxygen-consuming eukaryotic cell uses to equilibrate the generation/recycling of either physiological or toxic oxygen byproducts. Briefly, along with superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) and catalase (CAT; EC 1.11.1.6), GPx participate in the recycling of free radicals, of activated forms of oxygen (such as hydrogen peroxide [H_2O_2]), and of some peroxidized compounds resulting from the rapid attacks of organic molecules by reactive oxygen species (ROS; see Figure 1). Both GPx and CAT mediate the same reaction, which is the recycling of H_2O_2 into water. But these 2 enzymes have specific domains and characteristics of action. Catalase is a

peroxisome-located enzyme that will recycle only H_2O_2 and will be activated when cellular H_2O_2 concentrations are far above physiological levels, during a so-called oxidative burst. Such nonphysiological situations of oxidative insults are reached in several stress conditions, and in that respect CAT is an acute stress-response scavenger. GPx deals with small physiological adjustment of H_2O_2 concentrations in both the intracellular and extracellular compartments. GPx are also more versatile than CAT in the substrates they can metabolize, because besides H_2O_2 GPx can recycle organic peroxidized molecules, including those in free polyunsaturated fatty acids (PUFA) and in complex membranes such as phospholipid hydroperoxides, and therefore act both as scavengers and as repairing enzymes. Thus, although CAT is a powerful H_2O_2 -recycling enzyme, GPx are viewed as the key regulators of H_2O_2 concentration and consequently of H_2O_2 -mediated attacks in and around most cells. This is a particularly important role in view of the range of actions devoted to H_2O_2 in cell physiology. To complete the picture, peroxiredoxins (PRDX; EC 1.11.1.5) also act as ROS scavengers at physiological ROS levels and

Supported by a grant-in-aid from the French Ministry of Higher Education, CNRS, INSERM, Ernst Schering Research Foundation, and CONRAD (CONtraceptive Research and Development).

Correspondence to: Dr Joël R. Drevet, GReD, UMR CNRS 6247-INSERM U931-Clermont Université, 24, avenue des Landais, 63171 Aubière cedex, France (e-mail: joel.drevet@univ-bpclermont.fr).

Received for publication December 21, 2010; accepted for publication March 21, 2011.

DOI: 10.2164/jandrol.110.012823

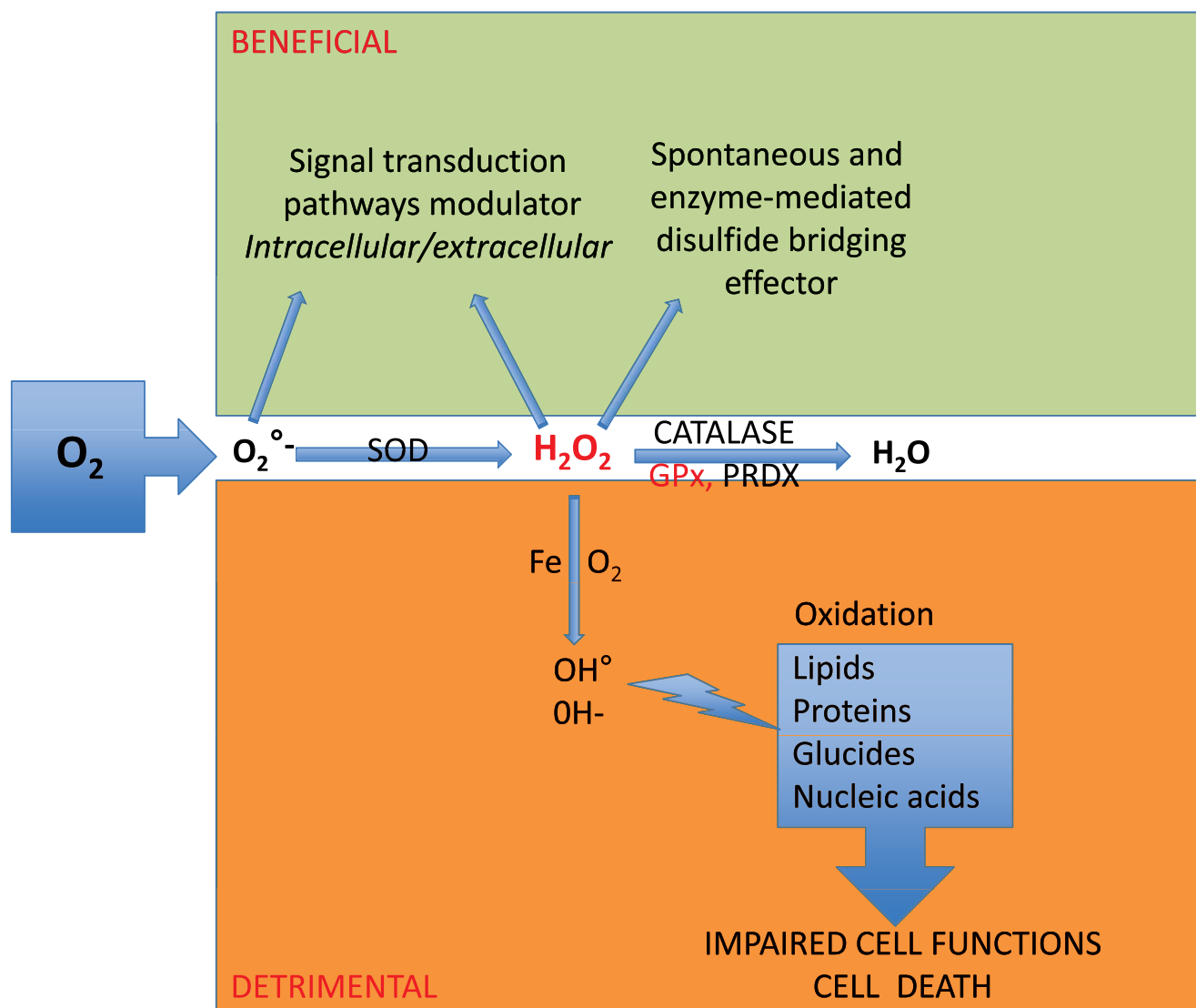


Figure 1. Hydrogen peroxide (H_2O_2) generation and recycling by the classical superoxide dismutase (SOD)/glutathione peroxidase (GPx)/catalase (CAT)/peroxiredoxin (PRDX) system. H_2O_2 arises from the activity of SOD, which recycles superoxide anion ($O_2^{\circ -}$) coming from oxygen catabolism. GPx, CAT, and PRDX recycle H_2O_2 into radical-free H_2O . H_2O_2 concentrations are kept under precise control in and out of the cell because H_2O_2 has both beneficial and detrimental effects on cell physiology. On the one hand, excessive accumulation of H_2O_2 due to increased generation or defective recycling will lead (in the presence of iron [Fe] and oxygen via the classical Fenton and Haber-Weiss biochemical reactions) to the production of very aggressive free radicals. Eukaryotic cells have no enzymatic equipment to deal with these free radicals that will damage every cell constituent starting with lipids in membranes. Excessive free radical-mediated damage will first impair cell functions and could, if not properly counteracted, lead to cell death. On the other hand, H_2O_2 is necessary for some physiological processes. First, it acts as a second messenger in signal transduction pathways, and it also modulates signal transduction cascades via its effect on cellular proteins that are sensitive to the redox state of the cell. Second, H_2O_2 either spontaneously, or via the action of enzymes such as disulfide isomerases, thiol peroxidases, and GPx, transforms free thiol groups carried by cysteine-containing proteins into disulfide bonds.

are considered as regulators of H_2O_2 concentration and ROS-dependent signaling events (Rhee et al, 2005).

Hydrogen peroxide can be considered as a “Dr. Jekyll and Mr. Hyde” molecule. When present in above-physiological concentrations it gives rise to very aggressive free radicals (OH° , OH^-) via the classical Fenton and Haber-Weiss biochemical reactions against which eukaryotic cells are devoid of efficient protection.

Excessive generation of such free radicals will affect all organic cellular components ranging from lipids in membranes to nuclear DNA material, ultimately leading to cell death (see Figure 1; Halliwell and Gutteridge, 1999). However, certain amounts of H_2O_2 and lipid hydroperoxides (LOOH) are necessary for normal cell physiology because these molecules also act as second messengers modulating intracellular signal transduction

pathways (Seiler et al, 2008; Bartz and Piantadosi, 2010; Conrad et al, 2010; Forman et al, 2010). In addition, H_2O_2 and LOOH are necessary substrates for numerous enzymes that use it to mediate disulfide bridging events in thiol-containing proteins. This is the case with disulfide isomerases/thiol peroxidases. Disulfide-bridging events are one type of posttranslational modification important for protein maturation. When occurring between sulfhydryl (SH^-) groups on one protein, they participate in its proper folding, whereas when disulfide bonds affect different proteins, they are involved in protein-protein interactions. Both phenomena greatly contribute to the activity of the respective proteins. During the last decade it has been reported that some GPx have the ability to work as bona fide disulfide isomerases, provided they contain in their primary amino acid sequence (outside their scavenger catalytic site) a cysteine residue that will be involved in disulfide-bridging events of thiol-containing protein targets (Delaunay et al, 2002). To mediate disulfide bond formation in thiol-carrying proteins, GPx require H_2O_2 or LOOH as cosubstrates. Thus GPx can either neutralize H_2O_2 by using glutathione (GSH) as a cofactor or mediate disulfide-bridging events by using H_2O_2 or LOOH and thiol-containing proteins. The common factor between both reactions is the presence of H_2O_2 or other organic hydroperoxides in the environment.

Alvarez and Storey (1989) were the first to point out the role played by GPx in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. Many years later, it was reported that failure of the expression of a GPx in spermatozoa was correlated with infertility in humans (Imai et al, 2001; Foresta et al, 2002). In the last 5 years, the development of mouse GPx knockout models (Conrad et al, 2005; Chabory et al, 2009; Imai et al, 2009; Liang et al, 2009; Schneider et al, 2009) associated with infertility or subfertility have demonstrated that GPx do indeed play important roles in mammalian sperm physiology.

Reactive Oxygen Species and Mammalian Spermatozoa: Friends and Foes

Among the 200 or so cell types constituting a higher vertebrate, there is no cell in which H_2O_2 presents such a paradoxical situation as in mature spermatozoa. On the one hand, H_2O_2 -mediated oxidative injuries of spermatozoa are a classical parameter accompanying male infertility, whether it is due to abnormal spermatogenesis, abnormal posttesticular steps of sperm maturation, aging, or pathological situations such as infection or inflammation (Aitken and Clarkson, 1987; Griveau and

Le Lannou, 1997; Aitken, 1999; Agarwal et al, 2006). In vitro, oxidative insults of spermatozoa are also major parameters influencing the success of assisted reproductive technologies such as in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as well as artificial insemination. Spermatozoa are indeed particularly susceptible to oxidative damage for 3 major reasons. First, mature posttesticular spermatozoa are silent cells that harbor a highly compacted haploid nucleus that is due to the meiotic process and the replacement of nucleosomal histones by protamines during late stages of spermatogenesis. Both contribute to silencing the paternal chromosomes that thus will not be able to engage any transcriptional activation when challenged by extracellular or intracellular stress, including oxidative stress. Second, spermatozoa are also silent in terms of protein synthesis because upon spermiation they lose most of their cytoplasm, and consequently the subcellular organelles that support protein translation, as well as their stock of cytosolic enzymes that might dampen intracellular cell stresses, again such as oxidative stress. Third, posttesticular spermatozoa are highly reactive to oxidative injury because of the peculiar lipid composition of their plasma membrane. If there are organic components that are the targets of choice of free radicals, these are lipids, and essentially those containing PUFA, that are prone to oxidation triggered by ROS. During posttesticular (ie, epididymal) maturation of spermatozoa, both the phospholipid fraction and the proportion of PUFA in this fraction are significantly increased. This increases the fluidity of the mature sperm plasma membrane and at the same time increases its susceptibility toward oxidative attacks. On the other hand, and rather paradoxically for a cell that is in danger of oxidative injury, spermatozoa were the first cells reported to generate significant levels of ROS (Tosic and Walton, 1946). This sperm-associated ROS generation is attributable to the high mitochondrial activity of fully motile spermatozoa. Besides this point, spermatozoa also exploit ROS, especially H_2O_2 , superoxide anion, and nitric oxide, as signaling actors in order to trigger the ultimate maturation steps in the female genital tract represented by the processes of capacitation and acrosome reaction (see for recent reviews de Lamirande et al, 1997; Baker and Aitken, 2004; O'Flaherty et al, 2006; de Lamirande and O'Flaherty, 2008). In addition, earlier on during the epididymal journey, in which spermatozoa progressively acquire their fertilizing potential, they also require the action of H_2O_2 that allows extensive sulfoxidation of various proteins in distinct sperm structures such as the nucleus, the acrosome, and the sperm midpiece (Cummins et al, 1986; Mate et al, 1994; Mammoto et al, 1997; Sivashanmugam and

Rajalakshmi, 1997). These disulfide-bridging events occurring during epididymal sperm maturation will complete the fine shaping of this highly differentiated cell (Seligman et al, 2005).

Thus, ROS exert dual actions on spermatozoa, being both beneficial and detrimental. This ambiguous situation is very well illustrated in the epididymis, where ROS-mediated beneficial actions (sulfoxidation) occur while spermatozoa are incapable of protecting themselves from the inherent damaging effect of ROS. To avoid oxidative insults of the maturing male gametes, the epididymal environment is involved in a balancing act, because on the one hand, it provides sufficient H_2O_2 to allow optimal disulfide-bridging events, whereas on the other hand, it also provides ROS scavengers to protect spermatozoa. A very fine control of the ROS generation or recycling balance is therefore expected to operate in the luminal compartment of the mammalian epididymis. This is corroborated by the observations that we and others have made, that the mammalian epididymis expresses a complex array of primary antioxidant scavengers, including several GPx that seem to occupy a central position in maintaining this balance.

Epididymal GPx in Mammals: ROS Scavengers and Thiol Peroxidases

We, and others, have shown that the mammalian epididymis expresses several GPx and, to date, it is the organ in which one can find expressed, although at different levels and in different subterritories, most of the known GPx, from GPx1 to GPx8 (Drevet, 2000, 2006). Within the GPx multigenic family, 4 members (GPx1, GPx3, GPx4, and GPx5) are particularly well represented and characterized and are located in the epididymal epithelium, in the luminal compartment, and in spermatozoa. Figure 2 presents a scheme of the localization of these GPx in the mouse epididymis, the picture being approximately the same in all the mammals that have been tested (reviewed in Vernet et al, 2004). Briefly, GPx1, GPx3, and cGPx4 are cytosolic enzymes expressed by the epididymal epithelial cells (essentially principal cells), whereas GPx5 is a secreted protein. GPx5 and GPx3 are quantitatively the most abundant GPx in the whole epididymis, representing altogether more than 95% of the epididymal GPx at both the mRNA and protein levels. Their differences essentially reside in the fact that GPx3 is a cytosolic enzyme increasingly expressed from the caput to the cauda epithelia, whereas GPx5 is a secreted enzyme whose expression and secretion is restricted to the caput epithelium. Another difference between GPx3 and GPx5 is the fact that GPx3 is a classical selenium-dependent GPx, whereas GPx5 belongs to the noncanonical

selenium-independent GPx (together with GPx6 and the predicted GPx7 and GPx8). Although it has long been suspected to be an inefficient GPx, we have demonstrated that GPx5 and other selenium-independent GPx can act as true H_2O_2 scavengers, as expected of the selenium-dependent members (Vernet et al, 1996, 1999; Herbette et al, 2007; Chabory et al, 2009). GPx1 and cGPx4 are expressed all along the epididymis epithelium at low levels compared with the other epididymal GPx. Both are cytosolic enzymes. Thus, the epididymal epithelium is protected mainly by GPx3, whereas the luminal compartment of the epididymis is protected by GPx5. In many mammals, GPx5 is a major secretion of the proximal epididymis duct (Belleannée et al, 2011). It moves along the epididymal duct with maturing spermatozoa and accumulates with them in the caudal storage compartment. The strong GPx5 caudal luminal content together with the high cauda epithelial cytosolic expression of GPx3 suggests that this territory is involved in protecting sperm cells and the epididymal tissue from peroxidative injuries.

To complete the picture of the epididymal localization of mammalian GPx, one should note that spermatozoa themselves carry GPx proteins. These sperm-bound GPx have been added to the spermatozoa during testicular spermatogenesis. This is the case for the sperm nucleus-associated isoform of GPx4 (snGPx4 or nuclear GPx4, nGPx4) and the mitochondria-associated isoform of GPx4 (mGPx4). Along with the cytosolic or cellular GPx4 variant (cGPx4), mGPx4 and snGPx4 arise from differential expression of the single-copy *GPx4* gene (Pushpa-Rekha et al, 1995; Godeas et al, 1997; Pfeifer et al, 2001; Maiorino et al, 2003; Moreno et al, 2003). Both sperm-associated mGPx4 and nGPx4 are precisely localized to the midpiece compartment and to the nucleus (Figure 2), respectively, during the final cyto-differentiation step of spermatogenesis.

Lessons From the Mouse GPx Knockout Models

GPx4 Knockout Models—Both the sperm-associated and sperm-restricted GPx4 variants (mGPx4 and nGPx4) have been shown to be associated with intracellular proteins and to function as disulfide isomerases rather than as classical ROS-scavenging GPx. Concerning the sperm midpiece-located mGPx4, it has been estimated that this isoform constitutes up to 50% of the sperm midpiece protein content that embeds the helix of mitochondria (Ursini et al, 1999). For that reason it was proposed that mGPx4 is the selenoprotein of the sperm midpiece, a role given earlier to a protein called sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein (Kleene, 1994). In the sperm midpiece, the mGPx4 protein is suggested to be more a structural protein than

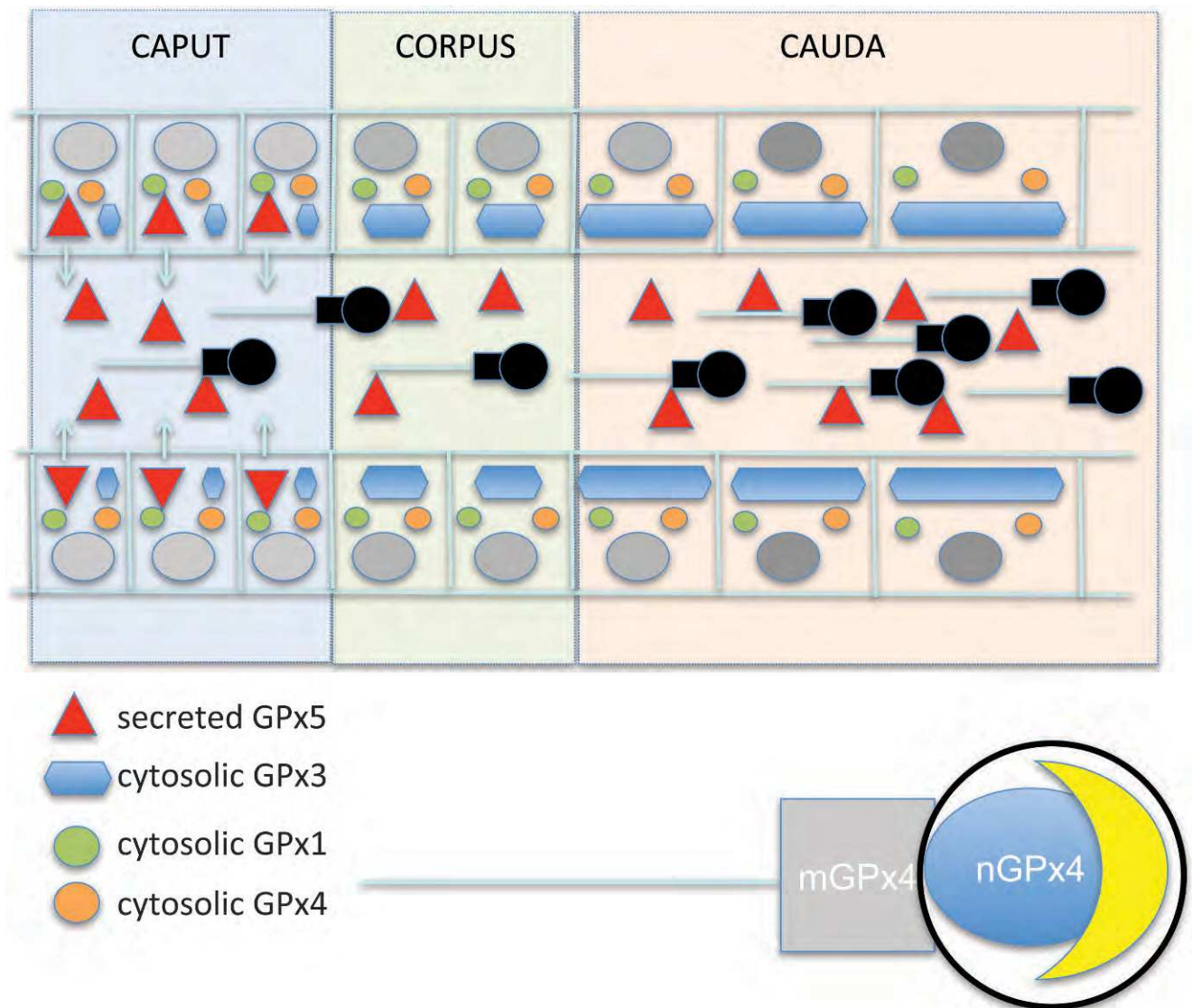


Figure 2. Glutathione peroxidase (GPx) localizations in the mammalian epididymis. Schematic representation of the GPx expression by the epididymal epithelium. GPx5 is abundantly expressed by the caput epithelium and the protein is secreted into the epididymal duct. The luminal GPx5 protein accompanies spermatozoa in transit and is stored with them in the cauda lumen. GPx3 is a cytosolic GPx increasingly expressed by the epididymal epithelium from the caput to the cauda. Besides these 2 major GPx, the epididymal epithelium (proximal to distal) expresses at lower levels the cytosolic GPx (GPx1 and cGPx4). In addition, epididymal spermatozoa carry 2 sperm-specific isoforms of GPx4, the mitochondria-associated mGPx4 (in the sperm midpiece) and the nucleus-associated nGPx4.

an active enzyme because it has been shown to have completely lost its solubility and its scavenging enzymatic properties (Ursini et al, 1999). It is, however, probable that the sperm midpiece-located mGPx4 is involved in local structural reorganization based on protein disulfide-bridging events. It has been shown that disulfide bonds in the late stages of spermatogenesis and during epididymal transit are important for several sperm structures (besides the nucleus), such as the plasma membrane, the midpiece, and the acrosome (Cummins et al, 1986; Mate et al, 1994; Francavilla et al, 1996; Mammoto et al, 1997; Sivashanmugam and

Rajalakshmi, 1997). In the sperm midpiece, during spermiogenesis, it has been shown that mitochondria attach to outer dense fiber proteins of the axoneme and that disulfide bonds in several proteins are involved in this process. As a result, the spermatid cytoplasm is reduced and the sperm plasma membrane is connected to the sperm midpiece. In addition, it has been shown that the acrosome contains the greatest relative amount of disulfides, before the head and the tail in guinea pig spermatozoa (Huang et al, 1984), suggesting that there are regionalized disulfide-bridging events during sperm maturation. The group of M. Conrad (Schneider et al,

2009) generated a transgenic mouse model in which the mGPx4 was disrupted via the introduction of an in-frame translational stop into the mitochondrial leader sequence of mGPx4. The analysis of this mouse model reveals that *mGPx4*^{-/-} mice are viable, contrary to the *GPx4*^{-/-} mice (in which the somatic isoform [cGPx4] as well as the 2 sperm-specific variants [mGPx4 and snGPx4] are absent) that die during early embryogenesis (Imai et al, 2003; Yant et al, 2003). Interestingly, the mouse *mGPx4*^{-/-} model showed male infertility associated with impaired sperm integrity. Essentially and quite logically, *mGPx4*^{-/-} spermatozoa showed important structural abnormalities in the midpiece region, leading to an increase in bent flagella, sperm heads detached from the flagellum, abnormal distribution of mitochondria along the midpiece, and abnormal organization of the axoneme (Schneider et al, 2009). In addition, and confirming the disulfide-bridging function of the protein mGPx4, deficient spermatozoa exhibit a higher protein thiol content, and their phenotype resembles what occurs in severe selenodeficiency situations (Flohé, 2007; Shalini and Bansal, 2008). Also not surprisingly, sperm motility was significantly reduced in *mGPx4*^{-/-} males. The authors showed that male infertility could be bypassed by ICSI, suggesting that the male gametes were unable to move properly as a consequence of sperm midpiece structural abnormalities and not because of their incapacity to initiate fertilization. Confirmation of these findings with regard to mGPx4 function was reported in Liang et al (2009) and Imai et al (2009). Using a different strategy, Liang et al (2009) generated transgenic mouse strains that carried mutations inhibiting the expression of either cytosolic or mitochondrial GPx4 and, consequently, overexpressing the other isoform. Their data confirmed that the mitochondrial GPx4 variant is testis- and male germ cell-specific. They also confirmed that when mGPx4 is not expressed, it leads to male infertility, essentially because of structural malformations of the sperm midpiece. The strategy used by Imai et al (2009) was to establish a spermatocyte-specific GPx4 knockout mouse via the Cre-loxP system. Again, this new transgenic mouse model showed oligoasthenozoospermia resulting in male infertility, confirming that a decrease in GPx4 activity in spermatozoa results in male infertility in mice.

The sperm nucleus-specific isoform of GPx4 (nGPx4) was shown to result from differential expression of its gene owing to the use of an alternative promoter located in the first intron (Moreno et al, 2003). This results in the expression of a GPx4 isoform having an N-terminus sequence rich in arginine residues, allowing its nuclear localization and binding to chromatin (Pfeifer et al, 2001). In sperm nuclei, the GPx4 variant has been

proposed to act as a protamine thiol peroxidase responsible for stabilizing the condensed chromatin by cross-linking protamine disulfides (Pfeifer et al, 2001). Condensation of sperm chromatin is an essential process in sperm differentiation, which starts during postmeiotic spermatogenesis with the replacement of somatic histones by transition proteins and finally by protamines. It appears that the sperm DNA-packaging process is not totally completed when spermatozoa leave the testis and that it goes on in the early stages of epididymal maturation. During epididymal transit, oxidation of protamine thiols plays an important role in compacting sperm DNA further and also locking it in that highly condensed state. The cross-linking of protamine disulfides induced by ROS is comparable to GSH oxidation and peroxide reduction catalyzed by GPx. Therefore, it has been proposed that the sperm-nucleus GPx4 variant uses protamine cysteine residues as reducing partners and acts as a protamine thiol peroxidase (Pfeifer et al, 2001). For its activity, the nGPx4 isoform would not depend on GSH availability, which decreases significantly in late spermatogenesis and early maturation during epididymal transit. In agreement with that hypothesis is the observation that in selenium-deficient animals, in which the concentrations of selenium-dependent GPx such as nGPx4 are greatly reduced, nearly all sperm cells recovered from the vas deferens possess incompletely compacted nuclei. In addition, in vitro experiments have shown that dithiothreitol provokes rat sperm DNA decondensation, an effect that is restored by adding H₂O₂ (Pfeifer et al, 2001). Finally, it has been shown that the use of an nGPx4 inhibitor blocks the condensation of sperm DNA. Together, these data strongly support the idea that the sperm nucleus-located GPx4 variant is responsible for protamine disulfide bridging within the sperm nucleus. In 2005, Conrad et al generated a transgenic mouse model in which they specifically abolished the expression of the sperm nucleus GPx4 isoform. In contrast to the full GPx4 knockout, *nGPx4*^{-/-} animals are viable and fully fertile, suggesting that the nGPx4 isoform is not responsible for the developmental defects observed when all the GPx4 isoforms are deleted (Imai et al, 2003; Yant et al, 2003). When spermatozoa from these *nGPx4*^{-/-} animals were investigated more closely, they did not show any obvious phenotype. When spermatozoa from *nGPx4*^{-/-} animals were compared to those of wild-type (WT) animals, it appeared that there was a delay in the completion of posttesticular sperm nucleus compaction. In the caput epididymis of *nGPx4*^{-/-} animals, sperm nuclei were less compacted than spermatozoa from the caput epididymis of WT animals. This delayed compaction was resumed later on, because there was no difference in the state of sperm

nuclei compaction for spermatozoa collected from the cauda compartment of *nGPx4*^{-/-} and WT animals (Conrad et al, 2005). These data support the idea that nGPx4 acts as a thiol peroxidase on thiol-containing sperm nuclear protamines in the caput compartment of the epididymis. The fact that normal sperm-DNA compaction is recovered in spermatozoa stored in the cauda compartment of the *nGPx4*^{-/-} animals suggests that one or more other thiol peroxidases most likely compensate for the lack of nGPx4 expression as the sperm cells travel along the epididymal tubule. Another possibility is that the cytosolic isoform (cGPx4), which is still expressed in testis of *nGPx4*^{-/-} mice, may partly back up nGPx4 deficiency because it is small enough to enter the nuclear pore (Weis, 1998; Conrad et al, 2005). Finally, although H₂O₂ is commonly believed to be rather inefficient in mediating -S-S- bridging directly, one cannot exclude the idea that spontaneous disulfide bridging occurs during epididymal migration of sperm cells providing there is enough H₂O₂ in the epididymal lumen to sustain it.

The GPx5 Knockout Model—The epididymally secreted GPx5 knockout model has brought some clear evidence that the epididymal lumen contains significant amounts of H₂O₂ that could be available for spontaneous or enzyme-mediated sulfoxidation. It has also been shown that epididymal GPx5 is a true ROS scavenger protecting epididymis-transiting sperm cells from ROS-mediated loss of integrity. The epididymis-specific GPx (GPx5) occupies a special position in the GPx family and was initially suspected not to behave as a true GPx. The peculiarity of GPx5 is the absence of the selenocysteine (SeCys) residue in its catalytic site (Ghyselinck et al, 1993), contrary to the other well-studied members of the mammalian GPx family (GPx1 to GPx4). In GPx5, the SeCys residue is replaced by a cysteine residue. Because of that, the scavenger activity of GPx5 was questioned, because in canonical GPx, if the SeCys residue of canonical GPx was replaced by a cysteine, there was a dramatic drop in the enzyme activity (Maiorino et al, 1995). However, we have shown in vitro that GPx5-transfected mammalian cells survive much better in oxidative conditions (increasing H₂O₂ concentrations in the cell medium) than control cells, suggesting that GPx5 at least in vitro is efficient in recycling H₂O₂ (Vernet et al, 1996). We have also demonstrated that mice subjected to a selenium-free diet, depleting their Se-dependent GPx activities, show an overall increase in peroxidative injury in every tissue except the epididymis, where GPx5 mRNA and protein levels are increased, backing up the failing Se-dependent activities (Vernet et al, 1999). This strongly suggests that in vivo as well, the Se-independent GPx5 protein acts as a true scavenger. Final clues proving the real scavenging

role of GPx5 in the epididymal environment came from the generation and analysis of a mouse strain that does not express GPx5 (Chabory et al, 2009). Lack of GPx5 expression in the epididymal lumen of the *GPx5*^{-/-} animals established an oxidative stress in the cauda epididymidis. GPx5 deficiency was not followed by any change in the ratio of free thiols to sulfoxide in spermatozoa, suggesting that GPx5 has nothing to do with disulfide-bridging events and therefore behaves as a conventional ROS-scavenging GPx. To cope with the pro-oxidative situation in the cauda compartment, the cauda epididymal epithelium of the *GPx5*^{-/-} animals transcriptionally up-regulated the 3 cytosolic GPx normally expressed there (GPx1, GPx3, and cGPx4). Up-regulation of these epididymal GPx was sufficient to maintain the total GPx activity of the tissue to a normal value. Transcription of the epithelial cytosolic CAT was also increased in the cauda epididymidis of the *GPx5*^{-/-} animals, reinforcing the idea that the tissue was facing an increase in H₂O₂ (Chabory et al, 2009) because CAT only metabolizes this substrate. These observations suggest that luminal ROS and especially H₂O₂ accumulate in the cauda compartment when GPx5 was no longer present. Despite the antioxidant response of the tissue, we have shown that the cauda epithelium of the *GPx5*^{-/-} animals suffers oxidative injuries. This was also the case for the cauda-stored spermatozoa. In particular, cauda-stored spermatozoa in *GPx5*^{-/-} animals showed a higher level of DNA oxidation, shown by the increase in 8-oxo-deoxyguanosine residues associated with increased fragmentation and a slight nuclear decompaction state compared with WT cauda-stored spermatozoa (Chabory et al, 2009). Although PRDX were not investigated in that study, it is possible that they also contributed to protect the cauda epididymis epithelium and spermatozoa against the pro-oxidant situation generated in the GPx5-deficient context, because several PRDX were very recently shown to be present on spermatozoa (Manandhar et al, 2009; O'Flaherty and de Souza, 2011).

Interestingly, in the caput epididymidis, sperm nuclei of the *GPx5*^{-/-} animals were significantly more condensed than those of WT animals, suggesting that absence of H₂O₂ recycling via GPx5 in the caput luminal compartment left more H₂O₂ available for the disulfide-bridging activity of the nGPx4 protein or favored spontaneous disulfide-bridging events of sperm nucleus protamines. If this is the correct hypothesis, then GPx5 that is secreted in the caput lumen indirectly participates in sperm DNA compaction by regulating the luminal epididymal concentration in H₂O₂. In the cauda compartment of the *GPx5*^{-/-} animals, we hypothesize that what we see are the results of prolonged exposure to the damaging effect of H₂O₂ on spermatozoa that leads

to DNA oxidation, increasing fragmentation, nucleus decompaction, and lipid peroxidation (Chabory et al, 2009). Spermatozoa themselves may contribute to this situation, because it has been reported that sperm mitochondria are inactive and devoid of membrane potential in the caput, whereas they are completely mature and functional, showing a membrane potential, in the cauda epididymidis (Koppers et al, 2008). Thus, it is possible that cauda-stored spermatozoa, although they are not in optimal conditions of oxygen tension, pH, and energy substrate to sustain full mitochondrial activity, might contribute to the generation of free radicals via a leakage of the electron transport chain.

Oxidative damage of cauda-stored spermatozoa have been shown to increase in aging *GPx5*^{-/-} animals (Chabory et al, 2009). The oxidative insults on the sperm DNA recorded in over-12-month-old *GPx5*^{-/-} males provoked a phenotype of subfertility when these males were mated with WT female mice of proven fertility. We have observed a significant decline in male fertility that was not due to impaired fertilization but to a clear rise in developmental defects, miscarriages, and perinatal mortality (Chabory et al, 2009). In the absence of an effect on fertilization rate, and because the female mice were perfectly normal, the types of defects in embryos generated from aging *GPx5*^{-/-} males indicate that loss of sperm DNA integrity is responsible. It has thus been assumed that oxidation of sperm DNA explains the effects recorded in the offspring of aging *GPx5*^{-/-} males, as has been suggested elsewhere (Aitken, 2009; Aitken and De Iuliis, 2009; De Iuliis et al, 2009). Such developmental defects due to alterations of the paternal chromosomal material have already been reported in humans (Tesarik et al, 2004, 2006).

Taken together, these data clearly demonstrate that GPx5 is an important luminal scavenger that protects cauda sperm cells from the damaging effects of H₂O₂. The physiological importance of GPx5 during aging has been highlighted, in agreement with the well-known free radical theory of aging, which maintains that a decline in ROS-scavenging activities with age allows free radicals to affect cell constituents and cell physiology in many ways. GPx5 therefore appears as quite an important enzyme that ultimately contributes to the maintenance of sperm DNA integrity and consequently to embryo viability. When it is absent, sperm DNA oxidation is too extensive for the reparative capacities of the oocyte, leading to abnormal developments. Without this protective protein, male mice run a high risk of siring offspring with developmental defects, including some severe enough to lead to miscarriage. This could be particularly relevant clinically for the fertility of the aging male and could also have an important effect on assisted reproductive technologies (Francavilla et al,

1996; Baker and Aitken, 2005; Aitken et al, 2008; Aitken, 2009; Aitken and De Iuliis, 2009; Chabory et al, 2009; Thomson et al, 2009), in which cryopreservation of the male gametes and micromanipulation in different media can be the sources of oxidative insults on the paternal chromosomal set.

Conclusions

The data presented in this review clearly illustrate the ambiguous situation existing in maturing epididymal spermatozoa. On the one hand, spermatozoa use ROS to mediate disulfide-bridging events that are necessary for the completion of their structural modifications. Sperm DNA compaction is one of these structural changes that are not completed when spermatozoa enter the epididymal tubule. The increased sperm DNA compaction ensured by protamine sulfoxidation in the epididymis is a crucial phenomenon that serves both to protect paternal DNA from mutational effects and to reduce the volume of the sperm head, allowing an optimum velocity of mature spermatozoa, both being critical for the success of fertilization. On the other hand, these ROS-mediated sulfoxidation events have to be particularly well balanced, because spermatozoa are particularly susceptible to oxidative insults that may have dramatic effects on their integrity and consequently on their fertilizing potential. GPx proteins appear to be the masters in controlling this fine equilibrium, acting either as disulfide isomerases or true GPx H₂O₂ scavengers. Whereas nGPx4 uses H₂O₂ or other organic hydroperoxides to perform sulfoxidation of protamines, which further compacts the sperm nucleus and locks it in this condensed state, the luminal GPx5 protein controls the amount of luminal H₂O₂ available for optimal sulfoxidation and also protects maturing spermatozoa against H₂O₂-mediated damage. This fine interplay between GPx proteins and H₂O₂ during the last steps of the generation of fully competent spermatozoa in the male genital tract may explain why oxidative stress is such a frequent parameter associated with male infertility, whether it comes from infections and infiltrating leucocytes, environmental toxicants, metabolic syndromes, aging, situations that are known to lead to excessive generation of ROS, or alteration of ROS scavengers.

References

- Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas Jr AJ, Alvarez JG, Sikka SC. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril*. 2006;86:878–885.
- Aitken RJ. The Amoroso lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis? *J Reprod Fertil*. 1999;115:1–7.
- Aitken RJ. GPx5 protects the family jewels. *J Clin Invest*. 2009;119:1849–1851.

- Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1987;81:459–469.
- Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damages in male germ cells. *Reprod Biomed Online*. 2007;14:727–733.
- Aitken RJ, De Iuliis GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 2009;6(1):3–13.
- Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl*. 2008;32:46–56.
- Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterized by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci*. 1998;111:645–656.
- Alvarez JG, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from the loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res*. 1989;2:77–90.
- Baker MA, Aitken RJ. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;216:47–54.
- Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;29:3–67.
- Bartz RR, Piantadosi CA. Clinical review: oxygen as a signaling molecule. *Crit Care*. 2010;14(5):234.
- Belleannée C, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Gatti JL, Dacheux JL, Dacheux F. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *J Proteomics*. 2011;74(1):59–78.
- Chabory E, Damon C, Lenoir A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Garrel C, Saez F, Cadet R, Henry-Berger J, Schoor M, Gottwald U, Habenicht U, Drevet JR, Vernet P. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 (GPx5) contributes to the maintenance of sperm DNA integrity. *J Clin Invest*. 2009;119:2074–2085.
- Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kölle S, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M, Bornkamm GW. The nuclear form of phospholipids hydroperoxide glutathione is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol*. 2005;25:7637–7644.
- Conrad M, Sandin A, Förster H, Seiler A, Frijhoff J, Dagnell M, Bornkamm GW, Rådmark O, Hoof van Huijsduijnen R, Aspenström P, Böhmer F, Ostman A. 12/15-lipoxygenase-derived lipid peroxides control receptor tyrosine kinase signaling through oxidation of protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15774–15779.
- Cummins JM, Fleming AD, Crozet N, Kuehl TJ, Kosower NS, Yanagimachi R. Labelling of living mammalian spermatozoa with the fluorescent thiol alkylating agent, monobromobimane (MB): immobilization upon exposure to ultraviolet light and analysis of acrosomal status. *J Exp Zool*. 1986;237:375–382.
- De Iuliis GN, Thompson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod*. 2009;81:517–524.
- de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*. 1997;2:48–54.
- de Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1784(1):106–115.
- Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*. 2002;111:471–481.
- Drevet JR. Glutathione peroxidases expression in the mammalian epididymis and vas deferens. In: Francavilla F, Francavilla S, Forti G, eds. *Andrology 2000*. L'Aquila, Italy: Collana di "Study Abruzzesi"; 2000:427–461.
- Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;250:70–79.
- Foresta C, Flohé L, Garolla A, Roveri A, Ursini F, Maiorino M. Male infertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Reprod*. 2002;67:967–971.
- Forman HJ, Maiorino M, Ursini F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*. 2010;49(5):835–842.
- Flohé L. Selenium in mammalian spermiogenesis. *Biol Chem*. 2007;388(10):987–995.
- Francavilla S, Cordeschi G, Gabriele A, Gianaroli L, Properzi G. Chromatin defects in normal and malformed human ejaculated and epididymal spermatozoa: a cytochemical ultrastructural study. *J Reprod Fertil*. 1996;106(2):259–268.
- Ghyselinck NB, Dufaure I, Lareyre JJ, Rigaudiere N, Mattei MG, Dufaure JP. Structural organization and regulation of the gene for androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. *Mol Endocrinol*. 1993;7:258–272.
- Godeas C, Tramer F, Micali F, Soranzo M, Sandri G, Panfili R. Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod*. 1997;57:1502–1508.
- Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl*. 1997;20:61–69.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press; 1999.
- Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J*. 2007;274:2163–2180.
- Huang TT, Kosower NK, Yanagimachi R. Localization of thiol and disulfide groups in guinea pig spermatozoa during maturation and capacitation using bimane fluorescent labels. *Biol Reprod*. 1984;31:797–809.
- Imai HN, Hakkaku R, Iwamoto J, Suzuki T, Suzuki Y, Tajima K, Konishi S, Minami S, Ichinose K, Ishizaka S, Shioda S, Arata M, Nishimura S, Naito S, Nakagawa Y. Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice. *J Biol Chem*. 2009;284(47):32522–32532.
- Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, Kitamoto T, Hayasaka M, Hanaoka K, Nakagawa Y. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305(2):278–286.
- Imai H, Suzuki K, Ishizaka K, Ichinose S, Oshima H, Okayasu I, Emoto K, Umeda M, Nakagawa Y. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol Reprod*. 2001;64:674–683.
- Kleene KC. The mitochondrial capsule selenoprotein—a structural protein in the mitochondrial capsule of mammalian sperm. In: RF Burk, ed. *Selenium in Biology and Human Health*. New York, NY: Springer-Verlag; 1994:135–148.
- Koppers AJ, De Iuliis GN, Nixon B, Kime M, Zelski K, McVicar CM, Lewis SE, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(8):3199–3207.
- Liang H, Yoo SH, Na R, Walter CA, Richardson A, Ran Q. Short form glutathione peroxidase 4 is the essential isoform required for survival and somatic mitochondrial functions. *J Biol Chem*. 2009;284(45):30836–30844.
- Maiorino M, Aumann KD, Brigelius-Flohe R, Doria D, Van Den Heuvel J, McCarthy J, Roveri A, Ursini F, Flohe L. Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by

- mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995;376:651–660.
- Maiorino M, Scapin M, Ursini F, Biasolo M, Bosello V, Flohe L. Distinct promoters determine alternative transcription of GPx4 into phospholipids-hydroperoxide glutathione peroxidase variants. *J Biol Chem*. 2003;278:34286–34290.
- Manandhar G, Miranda-Vizuete A, Pedrajas JR, Krause WJ, Zimmerman S, Sutovsky M, Sutovsky P. Peroxiredoxin 2 and peroxidase enzymatic activity of mammalian spermatozoa. *Biol Reprod*. 2009;80:1168–1177.
- Mammoto A, Matsumoto N, Tahara M, Yoneda M, Nishizaki T, Tasaka K, Miyake A. Involvement of a sperm protein sensitive to sulfhydryl-depleting reagents in mouse sperm-egg fusion. *J Exp Zool*. 1997;278:178–188.
- Mate KE, Kosower NS, White IG, Rodger JC. Fluorescent localization of thiols and disulfides in marsupial spermatozoa by bromobimane labelling. *Mol Reprod Dev*. 1994;37:318–325.
- Moreno SG, Laux G, Brielmeier M, Bornkamm GW, Conrad M. Testis-specific expression of the nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *J Biol Chem*. 2003;384:635–643.
- O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(4):528–540.
- O'Flaherty C, de Souza AR. Hydrogen peroxide modifies human sperm peroxiredoxins in a dose-dependent manner. *Biol Reprod*. 2011;84(2):238–247.
- Pfeifer HM, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW, Behne D. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J*. 2001;15:1236–1238.
- Pushpa-Rekha TR, Bursdall AI, Oleksa M, Chisolm GM, Driscoll DM. Rat phospholipids hydroxyperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J Biol Chem*. 1995;270:26993–26999.
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med*. 2005;38:1543–1552.
- Schneider M, Förster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F, Neumüller C, Deutsch MJ, Walch A, Hrabé de Angelis M, Wurst W, Ursini F, Roveri A, Maleszewski M, Maiorino M, Conrad M. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J*. 2009;23(9):3233–3242.
- Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Rådmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab*. 2008;8(3):237–248.
- Sivashanmugam P, Rajalakshmi M. Sperm maturation in rhesus monkey: changes in ultrastructure, chromatin condensation, and organization of lipid bilayer. *Anat Rec*. 1997;247:25–32.
- Shalini S, Bansal MP. Dietary selenium deficiency as well as excess supplementation induces multiple defects in mouse epididymal spermatozoa: understanding the role of selenium in male fertility. *Int J Androl*. 2008;31(4):438–449.
- Seligman J, Newton GL, Fahey RC, Shalgi R, Kosower NS. Nonprotein thiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa and epididymal fluid: role of gamma-glutamyl-transpeptidase in sperm maturation. *J Androl*. 2005;26(5):629–637.
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*. 2004;19:611–615.
- Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:715–721.
- Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iullis GN, Zieschang JA, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod*. 2009;24:2061–2070.
- Tosic J, Walton A. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect on respiration. *Nature*. 1946;158:485.
- Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohe L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*. 1999;285:1393–1396.
- Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategy in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;216:31–39.
- Vernet P, Rigaudiere N, Ghyselinck NB, Dufaure JP, Drevet JR. In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochem Cell Biol*. 1996;74:125–131.
- Vernet P, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y, Dufaure JP, Drevet JR. Selenium-independent epididymis-restricted glutathione peroxidase 5 protein (GPX5) can back up failing Se-dependent GPXs in mice subjected to selenium deficiency. *Mol Reprod Dev*. 1999;54:362–370.
- Weis K. Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus. *Trends Biochem Sci*. 1998;23(5):185–189.
- Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibata T, Belter JG, Motta L, Richardson A, Prolla TA. The selenoprotein GPx4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med*. 2003;34:496–502.

Publication 2 : Revue bibliographique

La protection post-testiculaire des gamètes mâles contre les dommages radicalaires

Le rôle de l'épididyme

A. Noblanc, A. Kocer, JR. Drevet

Médecine/Sciences, 2012, **28** : 519-525

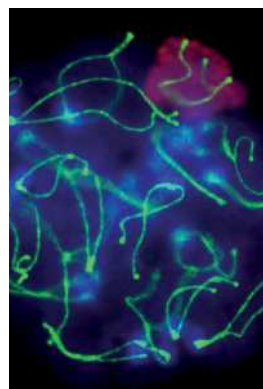
► Lorsqu'ils quittent le testicule, les spermatozoïdes sont fonctionnellement immatures et disposent de moyens de défense intrinsèques limités. Ils deviendront mobiles et féconds après leur descente et leur maturation progressive dans le tubule épидидymaire. L'épididyme assure aussi la survie et la protection des gamètes mâles pendant cette phase de maturation post-testiculaire et pendant la période de stockage entre deux éjaculations. Parmi les agressions communes auxquelles les spermatozoïdes sont soumis, le stress oxydant occupe une place particulière et ambiguë. Les événements de la maturation épидидymaire requièrent un certain niveau d'oxydation alors que le gamète mâle y est, par ailleurs, particulièrement sensible. Un équilibre très fin entre oxydation ménagée bénéfique et stress oxydant délétère est ainsi maintenu dans l'environnement épидидymaire. Les enzymes antioxydantes de la famille des peroxydases à glutathion à activité thiol peroxydase jouent un rôle clé dans le contrôle de cet équilibre. ◀

Un couple sur six dans le monde consulte en raison de difficultés à concevoir. Quand on retrace les origines de ces infertilités, un tiers mettent en cause les deux partenaires, un tiers sont uniquement d'origine féminine et un tiers uniquement d'origine masculine. Dans ce dernier groupe, il apparaît que, dans 50 % des cas, l'infertilité mâle est associée à un défaut de la spermatogenèse testiculaire. Pour l'autre moitié de ces infertilités mâles idiopathiques, la spermatogenèse est normale, mais c'est en aval du testicule que se situent les problèmes, essentiellement pendant la phase de maturation et de stockage épидидymaire des spermatozoïdes. Il est donc important d'étudier les phénomènes qui accompagnent cette maturation post-testiculaire des gamètes, et comment ces phénomènes peuvent être perturbés afin de comprendre et éventuellement de proposer des solutions thérapeutiques adaptées à ces patients infertiles.

Protection post-testiculaire des gamètes mâles contre les dommages radicaux

Le rôle de l'épididyme

Anaïs Noblanc, Ayhan Kocer, Joël R. Drevet



Laboratoire génétique, reproduction et développement (GRD), CNRS UMR 6293, Clermont Université, Inserm U1103, 24, avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.
joel.drevet@univ-bpclermont.fr

Fonctions de l'épididyme dans la maturation et la protection des spermatozoïdes

L'épididyme est un organe accolé au testicule, formé d'un très long tubule, fortement contourné, qui met en communication le testicule en amont *via* le *rete testis* et les canaux efférents avec le canal déférent en aval. C'est un dérivé du mésonephros embryonnaire apparu chez les amniotes (reptiles, oiseaux, mammifères) qui atteint son plein développement chez les mammifères. Chez ces derniers, l'épididyme est impliqué dans le transport et la maturation des spermatozoïdes ainsi que, dans sa partie terminale (queue ou *cauda*), dans le stockage des spermatozoïdes entre deux éjaculations [1-3] (Figure 1). La maturation post-testiculaire des spermatozoïdes recouvre un ensemble de processus complexes qui vont progressivement modifier structurellement et fonctionnellement les gamètes en transit et ainsi leur conférer leurs aptitudes fécondantes, c'est-à-dire l'expression de leur motilité et la capacité à reconnaître la zone pellucide de l'ovule et à fusionner avec ce dernier. L'épithélium composite pseudostratifié du tubule épидидymaire assure ces rôles essentiellement grâce à ses multiples activités de sécrétion et de réabsorption qui changent localement et séquentiellement la composition du fluide épидидymaire dans lequel baignent les gamètes (pour une revue récente voir [4]). Une expérience simple qui illustre l'importance de ce tissu dans la fertilité mâle chez les mammifères consiste à tester les capacités fécondantes de gamètes prélevés dans différentes régions du tubule

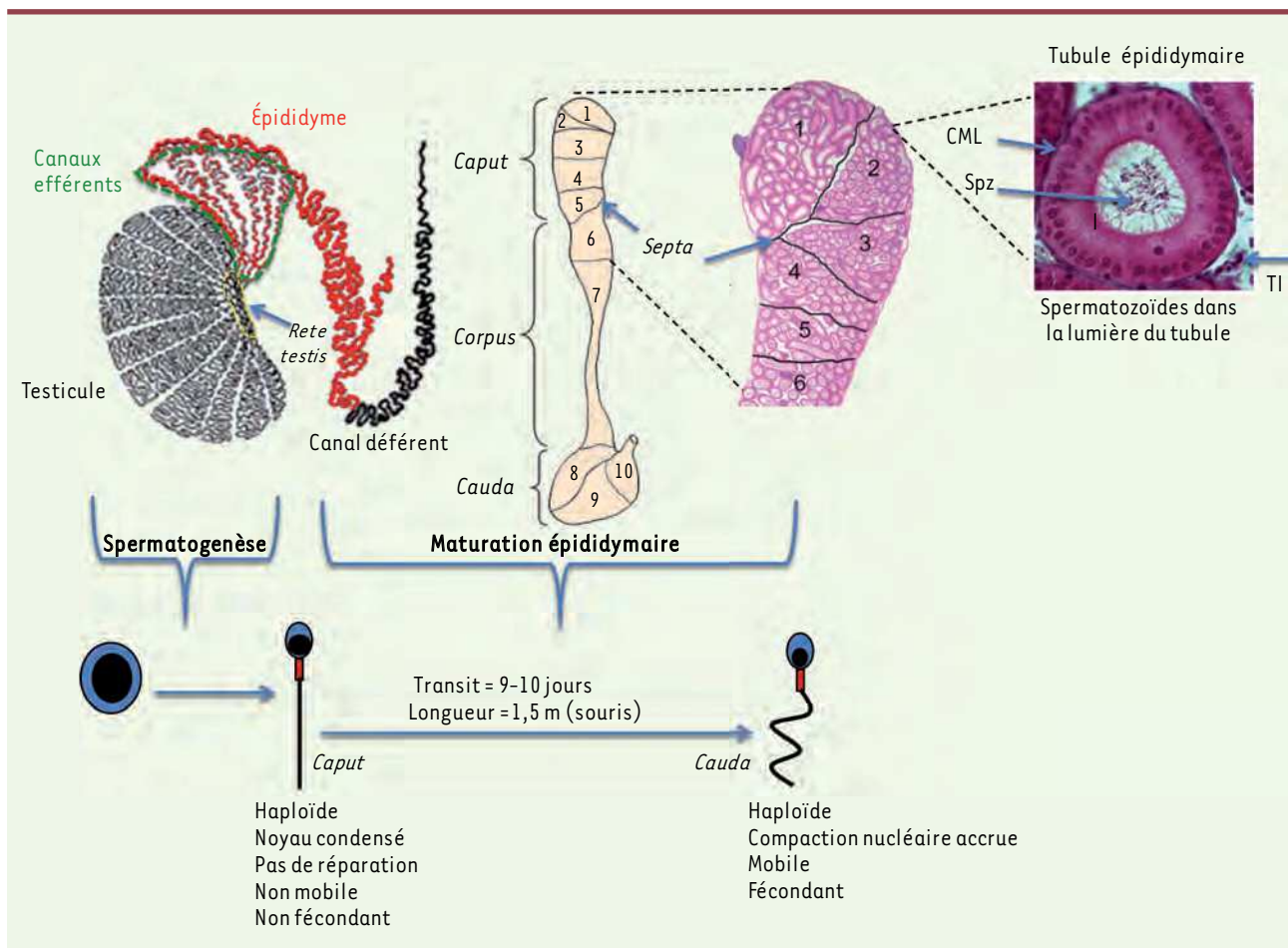


Figure 1. L'épididyme des mammifères. Les illustrations font référence au modèle murin. L'épididyme est le tubule rouge relié au hile du testicule via les canaux efférents et qui se poursuit ensuite par le canal déférent. L'épididyme est organisé en trois grandes régions anatomiques : la tête (ou *caput*), le corps (ou *corpus*) et la queue (ou *cauda*), elles-mêmes subdivisées en segments (numérotés de 1 à 10 chez la souris) séparés par des cloisons conjonctives (ou *septa*). Un seul et même tubule fortement pelotonné parcourt l'ensemble de l'organe. Le tubule est limité par un épithélium sécréteur pseudostratifié, lui-même entouré d'une assise de cellules musculaires lisses dont les contractions péristaltiques poussent les spermatozoïdes situés dans la lumière vers la partie terminale de l'organe, lieu de stockage des gamètes mâles entre deux éjaculations. À l'issue de la spermatogenèse testiculaire, les gamètes mâles haploïdes et cytodifférenciés sont des cellules quiescentes, incapables de se défendre et de mettre en jeu des processus de réparation. À leur entrée dans le tubule épидидymaire les gamètes mâles sont en outre fonctionnellement immatures, incapables de faire fonctionner leur flagelle, de reconnaître un gamète femelle et de fusionner avec lui. À la fin de la maturation épидидymaire, les spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme ont acquis leur pouvoir fécondant et seront mobiles dans un contexte permissif (l'environnement des voies génitales femelles). CML : cellules musculaires lisses, Spz : spermatozoïdes, TI : tissu interstitiel.

épидидymaire : les gamètes prélevés à leur entrée dans le tubule épидидymaire ne sont ni mobiles ni féconds. Motilité et pouvoir fécondant des spermatozoïdes augmentent pour les spermatozoïdes prélevés dans les régions plus distales du tubule épидидymaire. Associé à cette maturation fonctionnelle post-testiculaire des spermatozoïdes, l'épididyme assure aussi un rôle de « contrôle qualité » (voir par exemple [5]). Le nombre de spermatozoïdes présentant des morphologies aberrantes diminue entre la région proximale et la région distale du tubule épидидymaire suggérant que des processus de tri existent au cours de la maturation épидидymaire. Enfin, l'épididyme assure la survie et la protection de cette cellule particulière qu'est le

spermatozoïde. Ces processus de survie et de protection doivent être efficaces puisque le trajet épидидymaire des gamètes est de l'ordre de 10 à 12 jours chez les mammifères, excluant les temps de stockage qui sont liés à l'activité sexuelle du mâle. La protection des spermatozoïdes en transit dans le tubule et stockés dans la queue de l'épididyme se doit d'être particulièrement efficace, car le gamète mâle est une cellule fragile. Cette fragilité repose sur l'état quiescent de cette cellule qui, à l'issue de la spermatogenèse, est quasi silencieuse en termes de transcription et de traduction.

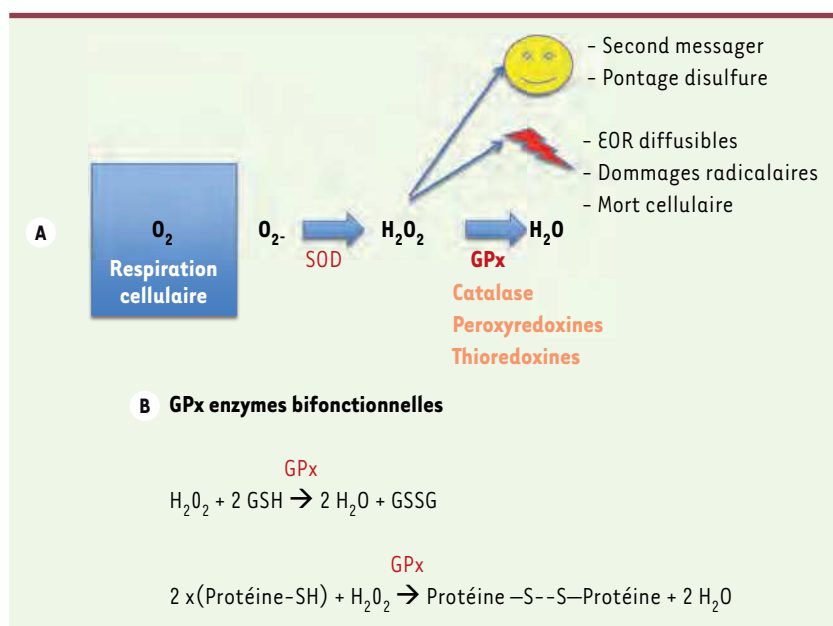


Figure 2. Stress oxydant et enzymes antioxydantes. **A.** Les espèces oxygénées réactives et leur recyclage. La respiration cellulaire mitochondriale est le principal site de production d'espèces oxygénées réactives (EOR) à partir de l'oxygène chez les eucaryotes aérobies. Le radical libre anion superoxyde (O_2^-) est pris en charge par la superoxyde dismutase (SOD) qui le transforme en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), une espèce activée de l'oxygène qui occupe une place carrefour dans cette voie de réduction univalente des EOR. H_2O_2 est nécessaire à la physiologie cellulaire en tant que second messenger dans l'activation des voies de transduction de signaux, et en tant que donneur d'électrons dans la génération de ponts disulfures au niveau des groupements thiols libres portés par les résidus cystéine de nombreuses protéines. Dans cette deuxième fonction, H_2O_2 agit comme un intermédiaire clef dans la maturation structurale et fonctionnelle de nombreuses protéines cellulaires. Cependant, accumulé de façon trop importante en intracellulaire comme en extracellulaire, H_2O_2 est à l'origine de dommages radicalaires (stress oxydant) qui affectent tous les composés cellulaires (lipides membranaires, glucides, protéines et acides nucléiques) conduisant à terme à la mort cellulaire. Afin d'ajuster finement les concentrations intracellulaires et extracellulaires en H_2O_2 , les cellules des eucaryotes aérobies utilisent une batterie d'antioxydants primaires non enzymatiques (glutathion, thioredoxine, vitamines) et enzymatiques (peroxydases à glutathion [GPx], catalase, peroxyredoxines, enzyme à activité thioredoxine-like). **B.** Les peroxydases à glutathion, des enzymes bifonctionnelles. Les GPx peuvent assurer deux types de réactions, qui toutes deux consomment et donc recyclent H_2O_2 . De façon classique, les GPx jouent le rôle d'enzymes anti-oxydantes en recyclant H_2O_2 en présence de deux molécules de glutathion (GSH). Dans des conditions limitantes en GSH, les GPx en présence de H_2O_2 peuvent être impliquées dans la formation de ponts disulfures inter- et intraprotéines portant des groupements thiols libres.

L'absence de transcription résulte de la compaction extrême de son lot chromosomique haploïde n'autorisant plus l'accès de l'ADN à la machinerie transcriptionnelle. Concernant la traduction, même s'il a été montré que les spermatozoïdes post-testiculaires pouvaient traduire de nouvelles protéines [6], le niveau de cette traduction est particulièrement faible en raison, d'une part, de l'absence de transcription et, d'autre part, de l'élimination de la très grande majorité du cytoplasme du spermatozoïde et des organites subcellulaires (→ Voir m/s n° 4, avril 2012, page 343), lesquels supportent la

traduction comme dans toute cellule. Ces deux caractéristiques structurales (compaction du noyau haploïde et élimination du cytoplasme à la spermiation) très particulières au spermatozoïde sont acquises pendant la dernière phase de la cytodifférenciation testiculaire des gamètes ou spermiogenèse [7, 8]. Ainsi, les gamètes mâles quittant le testicule n'ont pas la possibilité de répondre de façon autonome à une quelconque agression, ni en déclenchant une réponse au stress reposant sur l'engagement de gènes de défense, ni en mobilisant leurs maigres ressources cytoplasmiques en protéines de défense. Parmi les agressions auxquelles sont soumises les cellules, l'attaque radicalaire ou stress oxydant [9] constitue la plus commune et toutes les cellules d'un organisme aérobique y sont exposées. Plus que toute autre cellule, le spermatozoïde est susceptible de subir des dommages radicalaires. La sensibilité du gamète mâle vis-à-vis de l'attaque radicalaire est en effet accrue par la composition lipidique particulière de sa membrane plasmique, riche en acides gras polyinsaturés, cibles de choix des espèces oxygénées réactives (EOR).

Le stress oxydant : un danger majeur pour les spermatozoïdes post-testiculaires

Dualité d'action de H_2O_2

Toutes les cellules des organismes aérobies consomment de l'oxygène pour produire de l'énergie qui participe aux phosphorylations oxydatives et au métabolisme cellulaire. Ce faisant, elles génèrent des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) ou EOR. Il est nécessaire de contrôler ces dérivés en raison de leur réactivité élevée et des réactions en chaîne qu'ils produisent lorsqu'ils attaquent des composés organiques, que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules (Figure 2A) [9]. Pour contrecarrer les effets nocifs de ces EOR, les cellules utilisent une batterie d'antioxydants primaires, enzymatiques et non enzymatiques, cytosoliques, membranaires et sécrétés. L'anion superoxyde (O_2^-), premier dérivé actif de l'oxygène, réactif sur son site de production mais peu mobile, est transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase (SOD). Cette espèce activée de l'oxygène est une espèce

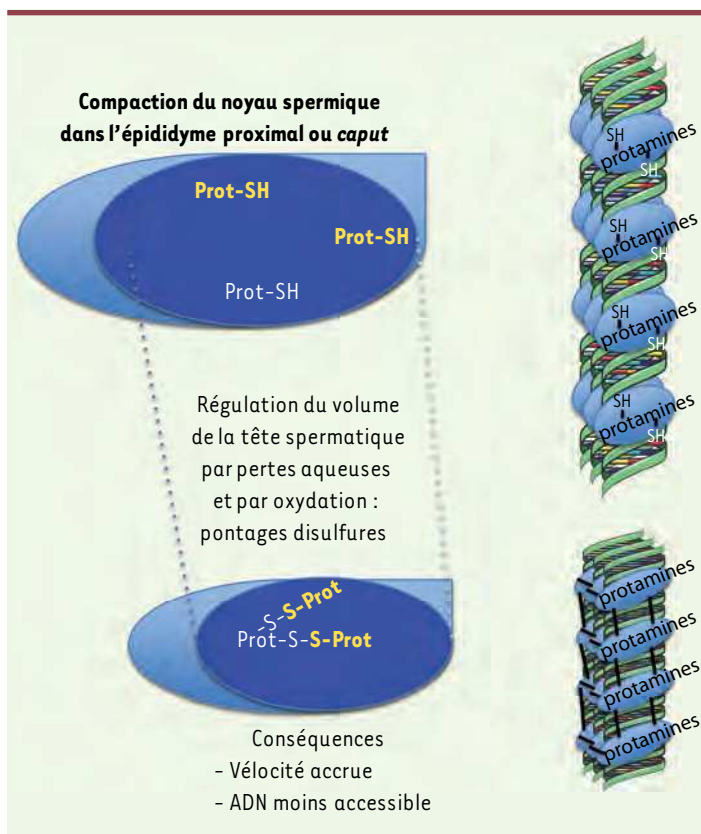


Figure 3. Condensation post-testiculaire du noyau spermatique. La compaction du noyau spermatique, qui débute lors de la spermiogenèse testiculaire par le remplacement des histones nucléosomales par les protamines, est poursuivie dans la tête de l'épididyme par l'oxydation des groupements thiols libres portés par les nombreux résidus cystéine contenus dans les protamines. Des mouvements d'eau et d'ions provoquent aussi dans ce compartiment proximal de l'épididyme des pertes aqueuses qui contribuent à la diminution de la taille de la tête spermatique. Ces processus de condensation/compaction accrue permettent au spermatozoïde d'acquies une vitesse optimale et confèrent au noyau spermatique, donc au patrimoine génétique paternel, une protection plus importante contre d'éventuels effets mutagènes.

les peroxydases à glutathion (GPx), les peroxyredoxines (PRDX) et les thiol peroxydases (TXN-like) de façon à recycler H_2O_2 (Figure 2A).

L'environnement épididymaire pro-oxydant

Cette dualité d'action de H_2O_2 sur les cellules, à la fois délétère et bénéfique, est mise en exergue lors de la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes au sein de l'épididyme [11]. En effet, comme nous l'avons vu ci-dessus, les spermatozoïdes sont très sensibles aux attaques oxydantes et utilisent H_2O_2 et/ou des dérivés lipidiques hydroperoxydés (LOOH) pour parfaire leur maturation. Plusieurs protéines spermatiques membranaires mais aussi internes au gamète sont soumises à une intense activité de pontage disulfure pendant la descente épididymaire [12-19]. L'évolution du rapport thiols libres/disulfides des protéines spermatiques en tête (10/1) et en queue d'épididyme (1/10) illustre ce phénomène. Les protamines nucléaires, qui ont remplacé les histones nucléaires pendant la spermiogenèse, sont parmi les protéines spermatiques soumises à cette activité d'oxydation. Le pontage inter- et intraprotamines qui en résulte au cours de la descente dans l'épididyme participe à la poursuite de la diminution de la taille de la tête spermatique et au verrouillage du noyau spermatique dans un état condensé (Figures 1, 2B et 3). Cette compaction accrue du noyau spermatique, et donc de la tête du spermatozoïde, au cours de la descente épididymaire est un événement important de la maturation post-testiculaire des gamètes contribuant à l'acquisition d'une vitesse optimale et à la protection du lot chromosomique paternel, deux critères essentiels du succès reproductif. Ces événements de pontage disulfure des protéines spermatiques

carrefour importante, potentiellement nocive mais aussi nécessaire dans plusieurs aspects du métabolisme cellulaire. À cause de son pouvoir de diffusion important, cet EOR est plus dangereux que l'anion superoxyde. En présence d'oxygène et de fer, selon les réactions biochimiques classiques de Fenton et d'Haber-Weiss, H_2O_2 pourra donner naissance à de nouveaux radicaux libres très agressifs (comme le radical hydroxyle) contre lequel les cellules peuvent peu ou pas se défendre, car elles sont dépourvues d'outils enzymatiques appropriés. Ces radicaux libres finiront par agresser tous les compartiments cellulaires, à commencer par les lipides dans les membranes cellulaires, perturbant leur fonction d'échange. Les dommages radicalaires s'étendront ensuite à tous les autres composés cellulaires y compris à l'ADN dans le compartiment nucléaire. Une accumulation trop importante de ces EOR peut alors conduire à la mort cellulaire [10]. À côté de ce rôle délétère, H_2O_2 a cependant des rôles bénéfiques indispensables à la physiologie cellulaire. Tout le monde connaît le rôle antibactérien du peroxyde d'hydrogène et son implication dans la réponse immune et dans l'inflammation. Moins connu, mais cependant très important, est le rôle de H_2O_2 dans la maturation des protéines via la création, spontanée ou assistée par des enzymes, de ponts disulfures sur les résidus thiols portés par les acides aminés cystéines. Tout aussi important est le rôle de H_2O_2 comme second messager inter- et intracellulaire, acteur dans la mise en œuvre et la modulation de voies de transduction de signaux. Ceci explique que les concentrations intracellulaires et extracellulaires en H_2O_2 doivent être finement régulées. À cet effet, les cellules des eucaryotes aérobies utilisent un ensemble d'enzymes antioxydantes telles que la catalase,

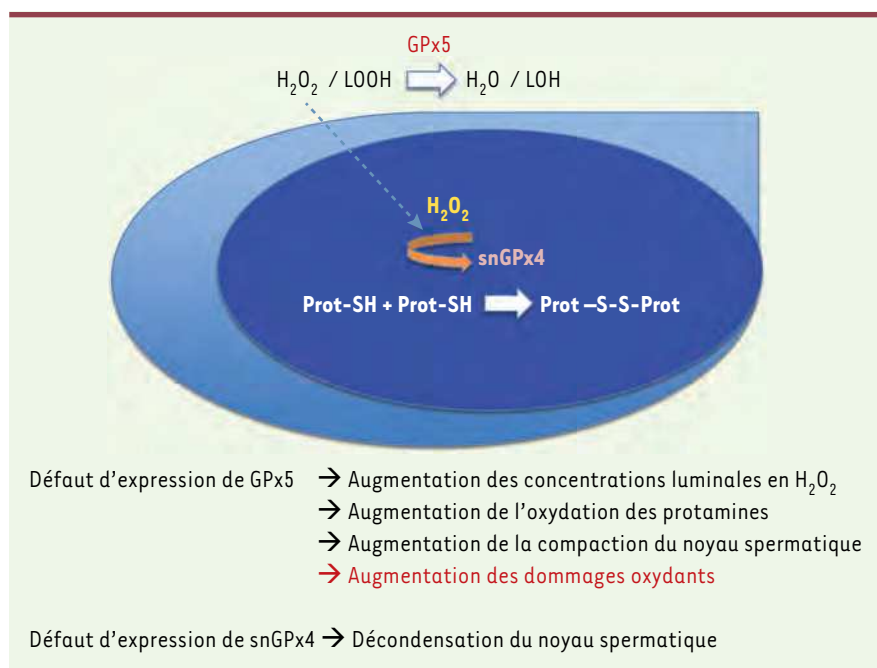


Figure 4. Rôles des GPx dans l'équilibre du stress oxydant dans le compartiment épididymaire. La glutathion peroxydase 5 (GPx5) sécrétée par l'épithélium de l'épididyme proximal contrôle le niveau luminal en H_2O_2 . Indirectement, elle définit par cette action le niveau optimal de pontage disulfure pouvant être réalisé sur les résidus thiols des protamines par le variant spermatique nucléaire de la GPx4 (snGPx4). L'analyse des modèles murins mutants invalidés pour ces activités GPx a montré que des défauts d'activité GPx5 luminaire provoquent transitoirement dans la tête de l'épididyme une compaction plus importante du noyau spermatique liée à une activité d'oxydation par snGPx4 accrue en raison de la plus grande disponibilité en H_2O_2 . Cependant, *in fine*, l'exposition luminaire des gamètes à des quantités d' H_2O_2 plus importantes est source de dommages radicalaires (peroxydation des lipides membranaires, atteintes oxydantes du noyau spermatique) pouvant affecter l'issue de la fécondation [21]. En parallèle, un défaut d'expression de la GPx4 du noyau spermatique entraîne des défauts de condensation du noyau spermatique dans la tête de l'épididyme [20].

incluant les protamines nucléaires requièrent un environnement épididymaire pro-oxydant (riche en H_2O_2 et/ou en LOOH) qu'il est nécessaire de contrôler de façon très fine, étant donné le risque de dommages oxydatifs. Des enzymes antioxydantes épididymaires assurent cet équilibre [11].

Le double rôle des enzymes antioxydantes de la famille des peroxydases à glutathion, GPx

En relation avec cette nécessité de préserver les fragiles gamètes mâles des dommages oxydants, nous avons démontré ces dernières années que l'épididyme des mammifères possède une couverture antioxydante importante. Cela se manifeste par l'expression de multiples formes d'antioxydants enzymatiques primaires dont certains sont même d'expression majoritaire ou quasi restreinte à cet organe [20]. C'est le cas de la glutathion peroxydase 5 (GPx5), une enzyme abondamment sécrétée par l'épithélium de la tête de l'épididyme qui accompagne les gamètes mâles tout le long de leur descente dans

le tubule épididymaire. Plusieurs autres GPx cytosoliques (GPx1, GPx3 et cGPx4) sont par ailleurs exprimées par l'épithélium épididymaire [20]. Le gamète mâle lui-même porte des GPx qui lui sont spécifiques, suite à l'expression de variants testiculaires de la GPx4 au cours de la spermatogénèse. C'est le cas de la snGPx4, un variant d'expression de la GPx4 localisé dans le noyau spermatique et de la mGPx4, un autre variant d'expression de la GPx4 localisé au niveau des mitochondries de la pièce intermédiaire. À côté de cette expression importante de multiples GPx, l'épididyme et les gamètes mâles présentent par ailleurs une couverture en peroxyredoxines (PRDX) et en diverses thiol-peroxydases [21].

Les GPx sont des enzymes bifonctionnelles pouvant fonctionner comme des recycleurs d'EOR (en particulier l' H_2O_2 , mais aussi les LOOH) ou comme des intermédiaires dans la formation de ponts disulfures (Figure 2B). Cette dualité fonctionnelle est particulièrement bien illustrée au cours de la maturation épididymaire des spermatozoïdes. Ainsi, Conrad *et al.* [22] ont démontré que la GPx4 du noyau spermatique (snGPx4) était associée aux

protamines et impliquée dans la formation de ponts disulfures intra- et interprotamines entre les groupes thiols portés par les nombreux résidus cystéines présents dans ces protéines nucléaires. C'est lors du passage dans la tête de l'épididyme que l'essentiel de cette activité de pontage disulfure est assurée par la snGPx4, dans un environnement qui doit fournir le H_2O_2 ou les LOOH nécessaires. Cette activité de pontage disulfure du noyau spermatique dans l'épididyme proximal contribue à diminuer encore la taille du noyau spermatique et à verrouiller le noyau spermatique dans un état condensé (Figure 3). Ces aspects sont particulièrement importants puisque, d'une part, ils définissent la taille de la tête spermatique qui elle-même conditionne la vélocité progressive rectiligne du spermatozoïde et, d'autre part, ils augmentent la protection du matériel nucléaire paternel contre les dommages à l'ADN de type agents intercalants ou molécules mutagènes. Ces deux caractéristiques,

vélocité optimale et matériel génétique intègre, sont les garants du succès reproductif.

L'ambiguïté réside dans le fait que pour assurer ces pontages disulfures, les gamètes mâles particulièrement sensibles aux dommages radicalaires doivent évoluer dans un environnement plutôt pro-oxydant. Il est donc nécessaire de contrôler de façon efficace le niveau d'EOR dans le tubule épидидymaire. C'est ici que la GPx5 sécrétée par l'épithélium de l'épididyme proximal intervient. La génération récente d'un modèle murin n'exprimant plus la GPx5, celui des souris *gpx5*^{-/-} [23], a permis de révéler que cette enzyme fonctionne dans la lumière du tubule épидидymaire comme un nettoyeur d'EOR, protégeant les spermatozoïdes contre les attaques radicalaires. Dans la tête de l'épididyme, le rôle de la GPx5 est double. D'une part, elle protège les gamètes de l'oxydation et, d'autre part, elle fixe le niveau de pontage disulfure en contrôlant la concentration luminale en H₂O₂ et/ou en LOOH. Le rôle de contrôleur indirect de la compaction du noyau spermatique en tête d'épididyme a été révélé par le fait que le noyau des spermatozoïdes de la tête d'épididyme de souris *gpx5*^{-/-} est sensiblement plus compacté que celui des spermatozoïdes des souris sauvages. Cette compaction accrue pourrait être due à la plus grande disponibilité en H₂O₂ et/ou LOOH favorisant ainsi l'activité snGPx4 en raison de l'absence de recyclage de ces EOR par GPx5 [11, 23] (Figure 4). En queue d'épididyme, la GPx5 assure essentiellement un rôle de protection des gamètes stockés contre les dommages radicalaires. En effet, les spermatozoïdes des animaux dépourvus de GPx5 présentent une peroxydation lipidique membranaire accrue et subissent des dommages oxydants à l'ADN révélés par la présence de bases oxydées et d'un noyau susceptible à la fragmentation. Dans ce fond génétique *gpx*^{-/-}, ces atteintes de l'intégrité du noyau paternel ont été corrélées (essentiellement chez les mâles âgés) à une augmentation du nombre de fœtus avortés et du nombre d'accidents de développements conduisant à des fœtus malformés, ainsi qu'à une augmentation de la mortalité périnatale [23].

Conclusions

Ces observations réalisées à l'aide de ces modèles murins transgéniques ont permis d'améliorer notre perception des événements de la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes. Longtemps considéré comme un simple tuyau, l'épididyme apparaît clairement maintenant comme un tissu essentiel à la fertilité mâle. Les phénomènes mis en exergue ici trouvent leur écho en clinique, comme en témoigne une littérature pléthorique qui atteste qu'une fraction importante des infertilités mâles est corrélée à des dommages oxydants des spermatozoïdes affectant la mobilité progressive, perturbant la capacité à réaliser la réaction acrosomique et conduisant à un niveau élevé de fragmentation nucléaire [24-37]. Cet équilibre précaire entre oxydation ménagée bénéfique et dommages oxydatifs au gamète mâle explique sans doute le fait que les dommages radicalaires au spermatozoïde soient une cause si fréquente de l'infertilité mâle, qu'elle soit d'origine génétique, métabolique, secondaire aux expositions environnementales, ou tout simplement liée à l'âge. Oxydation et fragmentation du noyau

spermatique sont de même corrélées au succès reproductif en procréation médicalement assistée (PMA). En outre, les technologies de la PMA peuvent elles-mêmes être à l'origine d'atteintes oxydatives du gamète mâle (par exemple l'utilisation de sperme congelé qui subit une explosion oxydative lors de son réchauffement). Si une mobilité spermatique diminuée et/ou une capacité à déclencher la réaction acrosomique perturbée vont diminuer les taux de fécondation, les dommages radicalaires au noyau paternel sont autrement plus dangereux. L'ovule est sensé réparer les dommages à l'ADN paternel et ses capacités de réparation sont grandes. Cependant, dans un contexte de réparation déficiente, comme cela peut-être le cas dans un ovule non optimal (femme âgée, PMA avec une « superovulation » provoquée par l'administration d'hormones, PMA via l'injection intracytoplasmique de spermatozoïdes [ICSI]), certains dommages à l'ADN courent le risque d'être transmis à la descendance et d'être à l'origine de pathologies. ♦

SUMMARY

Post-testicular protection of male gametes from oxidative damage. The role of the epididymis

Spermatozoa leave the testis in an immature functional state and are devoid of self defense mechanisms. They will become motile and ready to fertilize only after their descent and their progressive maturation within the epididymal tubule. The epididymis also ensures the survival and the protection of male gametes while they go through the epididymis and during their storage in between two ejaculations. Amongst common stresses that concern spermatozoa, oxidative stress occupies a peculiar and dual position. While the events of epididymal sperm maturation necessitate a given level of oxidation, spermatozoa are particularly sensitive to oxidative damage. A fine balance between beneficial oxidation versus detrimental oxidative damage has to be maintained in the epididymal environment. Antioxidant enzymes of the glutathione peroxidase family play a key role in controlling such a situation in the epididymis. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Orgebin-Crist MC, Danzo BJ, Davies J. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In : Greep R, Hamilton DW, eds. *Handbook of physiology-endocrinology V*. Baltimore : Williams and Wilkins, 1975 : 319-38.
2. Bedford JM. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In : Greep R, Hamilton DW, eds. *Handbook of physiology-endocrinology V*. Baltimore : Williams and Wilkins, 1975 : 302-17.

RÉFÉRENCES

3. Hinton BT, Palladino MA, Rudolph D, Labus JC. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1995 ; 7 : 731-43.
4. Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009 ; 15 : 213-27.
5. Cornwall GA, von Horsten HH, Swartz D, et al. Extracellular quality control in the epididymis. *Asian J Androl* 2007 ; 9 : 500-7.
6. Gur Y, Breitbart H. Protein synthesis in sperm : dialog between mitochondria and cytoplasm. *Mol Cell Endocrinol* 2008 ; 282 : 45-53.
7. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa : comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991 ; 44 : 569-74.
8. Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa : more than the sum of its parts ? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 2010 ; 139 : 287-301.
9. Migdal C, Serres M. Espèces oxygénées réactives et stress oxydant. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 405-12.
10. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 1984 ; 1 : 1396-7.
11. Noblanc A, Kocer A, Chabory E, et al. Glutathione peroxidases at work on epididymal spermatozoa : an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. *J Androl* 2011 ; 32 : 641-50.
12. Calvin HL, Bedford JM. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil* 1971 ; 13 : 65-75.
13. Bedford JM, Calvin HL. Changes in -S-S- linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species. *J Exp Zool* 1974 ; 187 : 137-56.
14. Shalgi R, Seligman J, Kosover NS. Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biol Reprod* 1989 ; 40 : 1037-45.
15. Seligman J, Kosover NS, Weissenberg R, Shalgi R. Thiol-disulfide status of human sperm proteins. *J Reprod Fertil* 1994 ; 101 : 435-54.
16. Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J, Watkins B. Identification of bull protamine disulfides. *Biochemistry* 2001 ; 30 : 175-81.
17. Yeung CH, Barfield JP, Cooper TG. Physiological volume regulation by spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* 2006 ; 250 : 98-105.
18. Huang HF, Nieschlag E. Alteration of free sulphhydryl content of rat sperm heads by suppression of intratesticular testosterone. *J Reprod Fertil* 1984 ; 70 : 31-8.
19. Golan R, Cooper TG, Oschry Y, et al. Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Hum Reprod* 1996 ; 11 : 1457-62.
20. Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol* 2006 ; 250 : 70-9.
21. O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med* 2006 ; 41 : 528-40.
22. Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, et al. The nuclear form of phospholipids hydroperoxide glutathione is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol* 2005 ; 25 : 7637-44.
23. Chabory E, Damon C, Lenoir A, et al. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 (GPx5) contributes to the maintenance of sperm DNA integrity. *J Clin Invest* 2009 ; 119 : 2074-85.
24. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, et al. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997 ; 68 : 519-24.
25. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, et al. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish first pregnancy planner study team. *Fertil Steril* 2000 ; 73 : 43-50.
26. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001 ; 75 : 674-77.
27. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2004 ; 19 : 611-5.
28. Lewis SE, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 2005 ; 4 : 657-66.
29. O'Brien J, Zini A. Sperm DNA integrity and male infertility. *Urology* 2005 ; 65 : 16-22.
30. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: importance in the era of assisted reproduction. *Curr Opin Urol* 2006 ; 16 : 428-34.
31. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* 2006 ; 175 : 495-500.
32. Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online* 2006 ; 12 : 715-21.
33. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol* 2007 ; 33 : 603-21.
34. Marchesi DE, Feng HL. Sperm DNA integrity from sperm to egg. *J Androl* 2007 ; 28 : 481-9.
35. Aitken RJ, De Luliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 2008 ; 32 : 46-56.
36. Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, et al. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 2005 ; 26 : 741-8.
37. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation : mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010 ; 93 : 1027-36.
38. Al Rawi S, Galy V. L'alophaie, ou comment l'embryon élimine les mitochondries et autres organites paternels. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 343-7.

TIRÉS À PART

J.R. Drevet



Publication 3 : Article original

Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice

A. Noblanc, M. Peltier, C. Damon-Soubeyrand, N. Kerchkove, E. Chabory, P. Vernet, F. Saez,
R. Cadet, L. Janny, H. Pons-Rejraji, M. Conrad, JR. Drevet, A. Kocer

PLoS ONE, 2012, **7** (6) : e38565

Epididymis Response Partly Compensates for Spermatozoa Oxidative Defects in snGPx4 and GPx5 Double Mutant Mice

Anaïs Noblanc¹, Manon Peltier², Christelle Damon-Soubeyrand¹, Nicolas Kerchkove¹, Eléonore Chabory³, Patrick Vernet¹, Fabrice Saez¹, Rémi Cadet¹, Laurent Janny^{1,4}, Hanae Pons-Rejraji^{1,4}, Marcus Conrad⁵, Joël R. Drevet^{1*}, Ayhan Kocer¹

1 Genetics Reproduction & Development laboratory, CNRS UMR 6293 - INSERM U1103 - Clermont Université, Aubière, France, **2** Institut Curie, Paris, France, **3** Laboratoire d'Assistance Médicale à la Procréation, Département gynécologie-obstétrique, Hôpital Porte Madeleine, Orléans, France, **4** CHU Estaing, Assistance Médicale à la Procréation, Clermont-Ferrand, France, **5** German Center for Neurodegenerative Diseases, Munich, Germany and Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Institute of Developmental Genetics, Neuherberg, Germany

Abstract

We report here that spermatozoa of mice lacking both the sperm nucleus glutathione peroxidase 4 (snGPx4) and the epididymal glutathione peroxidase 5 (GPx5) activities display sperm nucleus structural abnormalities including delayed and defective nuclear compaction, nuclear instability and DNA damage. We show that to counteract the GPx activity losses, the epididymis of the double KO animals mounted an antioxidant response resulting in a strong increase in the global H₂O₂-scavenger activity especially in the cauda epididymis. Quantitative RT-PCR data show that together with the up-regulation of epididymal scavengers (of the thioredoxin/peroxiredoxin system as well as glutathione-S-transferases) the epididymis of double mutant animals increased the expression of several disulfide isomerases in an attempt to recover normal disulfide-bridging activity. Despite these compensatory mechanisms cauda-stored spermatozoa of double mutant animals show high levels of DNA oxidation, increased fragmentation and greater susceptibility to nuclear decondensation. Nevertheless, the enzymatic epididymal salvage response is sufficient to maintain full fertility of double KO males whatever their age, crossed with young WT female mice.

Citation: Noblanc A, Peltier M, Damon-Soubeyrand C, Kerchkove N, Chabory E, et al. (2012) Epididymis Response Partly Compensates for Spermatozoa Oxidative Defects in snGPx4 and GPx5 Double Mutant Mice. PLoS ONE 7(6): e38565. doi:10.1371/journal.pone.0038565

Editor: Alexander James Roy Bishop, University of Texas Health Science Center at San Antonio, United States of America

Received: March 16, 2012; **Accepted:** May 7, 2012; **Published:** June 14, 2012

Copyright: © 2012 Noblanc et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Institutional funding from the CNRS, the INSERM and The French Ministry of Higher Education. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: JRD is a PLoS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: joel.drevet@univ-bpclermont.fr

Introduction

In mammalian reproduction, either naturally or by assisted reproductive technologies (ART), gamete quality is a key criterion. Sperm DNA integrity is a particularly important parameter concerning the contribution of the male gamete to successful reproduction. There are many reports of adverse clinical effects including depressed fertility, an increased incidence of miscarriage, and offspring morbidity following degradation of paternal chromosomes [1–13]. To avoid these potentially adverse conditions, eutherian mammals evolved elaborate processes to protect the paternal chromosomes from loss of integrity, the most obvious being the highly compacted state of the sperm nucleus. Sperm nucleus compaction is a process that is mainly achieved during testicular spermiogenesis by the extensive replacement of nuclear histones by smaller basic proteins, the protamines [14,15]. During the drastic cyto-differentiation step occurring at the end of mammalian spermatogenesis, compaction of the sperm haploid genome to approximately one tenth the size of the nucleus of any somatic cell serves two major purposes. It provides optimal velocity of

spermatozoa and protects the paternal chromosomes from mutagenic effects of both intrinsic and extrinsic origins. At the end of the testicular spermatogenic program, sperm nucleus compaction is not complete, but proceeds further as spermatozoa pass through the epididymis tubule. During this post-testicular step of sperm maturation, increased nucleus compaction is achieved by osmotic regulation/water resorption and intense disulfide bridging of thiol-containing protamines [16–23].

The recent generation of knockout mouse models has allowed a better understanding of how disulfide-bridging events drive this aspect of post-testicular sperm nucleus enhanced compaction. Bi-functional glutathione peroxidase enzymes that can work either as H₂O₂/LOOH-recycling enzymes or disulfide isomerases were shown to play key roles in this process. On the one hand, mice lacking the sperm nucleus-located isoform of glutathione peroxidase 4 (snGPx4, a selenium-dependent GPx) present a delay in post-testicular (i.e., proximal epididymis) sperm nuclear compaction [24]. This phenotype demonstrated snGPx4 to be an active disulfide isomerase whose task is to increase sperm nucleus compaction through H₂O₂-mediated

(or/and LOOH-mediated) oxidation of protamines during early spermatozoa epididymal journey [24,25]. On the other hand, we have shown previously that deletion of the epididymal luminal H_2O_2 -scavenger (GPx5, a selenium-independent GPx) resulted in a transient increase in caput epididymal sperm DNA compaction [26]. This effect probably resulted from increased protamine disulfide-bridging *via* snGPx4 because of the luminal increase in H_2O_2 and/or LOOH availability due to the lack of GPx5 activity [26,27]. Thus, we have proposed that GPx5 *via* its epididymal luminal scavenger function acts as a coordinator enzyme that controls the concentration of H_2O_2 /LOOH in the caput lumen, thereby defining the optimal disulfide-bridging activity of snGPx4 in the caput territory. In addition, throughout the epididymis and especially in the cauda territory, the ROS-scavenging function of GPx5 protects epididymal transiting and cauda-stored spermatozoa from oxidative injuries [26,27]. To analyze further the importance of these two enzymes in the physiology of the epididymis and in sperm maturation, we have generated transgenic mice lacking both snGPx4 and GPx5. We present here the epididymal and spermatozoa phenotypes of these double mutant animals.

Results

Generation of Double Transgenic *sngpx4:gp5*^{-/-} Mice

Null mice for snGPx4 and GPx5 were generated following crosses of inbred *sngpx4*^{-/-} animals [24] and *gp5*^{-/-} animals [26] that were initially produced in the same C57bl/6 genetic background. Genotyping data shown in Figure 1 illustrate that the homozygous derived *sngpx4:gp5*^{-/-} animals carry the transgenic constructs and, therefore, are devoid of functional snGPx4 and GPx5 genes. As for each single KO, simultaneous *sngpx4* and *gp5* inactivation had no impact on the organization of the epididymis tissue (as evidenced by histological observation) or caput or cauda sperm counts (monitored at 4 months of age), suggesting that lack of snGPx4 and GPx5 expression does not affect sperm production and epididymal transit and function (not shown).

Spermatozoa of Double Mutant Male Mice Show Impaired Sperm DNA Compaction

As shown by toluidine blue staining in caput and cauda sperm of the double KO animals at 4 months and 8 months of age, a large proportion (up to 80%) of the double mutant caput sperm population showed defective nuclear condensation (Figure 2A and 2B). However, sperm DNA compaction resumed an apparently normal level in cauda-collected spermatozoa of the double mutants (Fig. 2C).

Impaired Sperm DNA Compaction in the Double Mutant Animals is Associated with a Giant Head Sperm Phenotype

Shorr staining (Figure 3A) showed that 30 to 35% of the caput sperm population had a giant head phenotype irrespective of mice age (4 or 8 months, Figure 3B). Again, this is a caput restricted sperm phenotype, because less than 0.2% of the cauda sperm population exhibited this morphological alteration (data not shown). Using PNA-Alexa and Hoechst staining to detect the acrosomal and the nuclear sperm compartments, respectively, we show in Figure 3C, that the giant sperm head phenotype of the double mutant mice was essentially due to nuclear expansion (as evidenced by the Hoechst staining) while the acrosome-staining was not dramatically different from that of the WT spermatozoa.

Nuclear Susceptibility to Reducing Conditions of Double Mutant Cauda Spermatozoa

Although sperm nucleus size was similar to that of WT in the cauda compartment of double mutant animals (see Figure 2C), Figure 4 shows that these spermatozoa remained very sensitive to reducing conditions such as treatment with dithiotreitol (DTT). When applied on cauda-retrieved double mutant spermatozoa, it provoked nuclear expansion and the reappearance of the giant head phenotype for a larger proportion of spermatozoa compared to WT animals. This data reveals that cauda sperm nuclei of double mutant animals did not reach their optimal and solid condensed state compared to WT animals.

Nuclear Expansion in Spermatozoa of Double Mutant Animals is neither Due to Defective Protamination nor to Decreased Disulfide Bridging

Since we recorded no differences in the spermatozoa phenotype of the double mutant animals at 4 and 8 months, all further experiments were carried out on spermatozoa from animals aged 4 months. Because snGPx4 is located in the sperm nucleus during spermiogenesis, it may be argued that its absence could somehow impair the process of histone replacement by protamines, eventually leading to defective sperm nuclear protamination in the double mutant. We used flow cytometry and chromomycin A3 as a probe to evaluate indirectly the protamine content of WT and double mutant spermatozoa. Figure 5A first shows that sperm nuclear compaction was increased during spermatozoa epididymal journey from the caput to the cauda irrespective of the genetic background. This Figure also indicates that there was no significant difference in the percentage of recorded fluorescence due to chromomycin A3 staining both in caput and cauda double mutant spermatozoa when compared to WT spermatozoa. Defective testicular protamination is therefore unlikely to explain sperm nuclear decondensation in the double mutants.

To obtain an evaluation of epididymal disulfide-bridging activity, flow cytometry and a monobromobimane probe were used to monitor the free thiol content of sperm proteins in WT and double mutant animals. Figure 5B first illustrates increase in sperm disulfide-bridging events during spermatozoa epididymal journey from the caput to the cauda irrespective of the genetic background. In addition, and in contrast to what might have been logically expected in a context of defective snGPx4 disulfide bridging activity, Figure 5B also shows that caput and, to a lesser extent cauda sperm samples of double mutant animals, contained less free thiol groups than WT controls. Since monobromobimane staining is inversely correlated with the number of disulfides, these data suggest that increased disulfide-bridging events took place in the epididymis (particularly in the caput compartment) of double mutant animals despite the absence of the snGPx4 player. This suggests that the epididymis of the double mutant animal has somehow found a way to enhance its global disulfide isomerase activity.

The Epididymis of Double Mutants Compensates for the Lack of ROS-scavenging Activity

Figure 6A shows that in the double mutant animals, global H_2O_2 -scavenging activity was up-regulated especially in the cauda compartment. The global H_2O_2 -scavenging activity recorded in the double mutant cauda territory exceeded by far that recorded in the same compartment in WT animals. As a physiological indicator, Figure 6A, also shows that the global H_2O_2 -scavenging activity recorded in the epididymis of double mutant animals was quite comparable to that found in liver, a tissue well-known for its

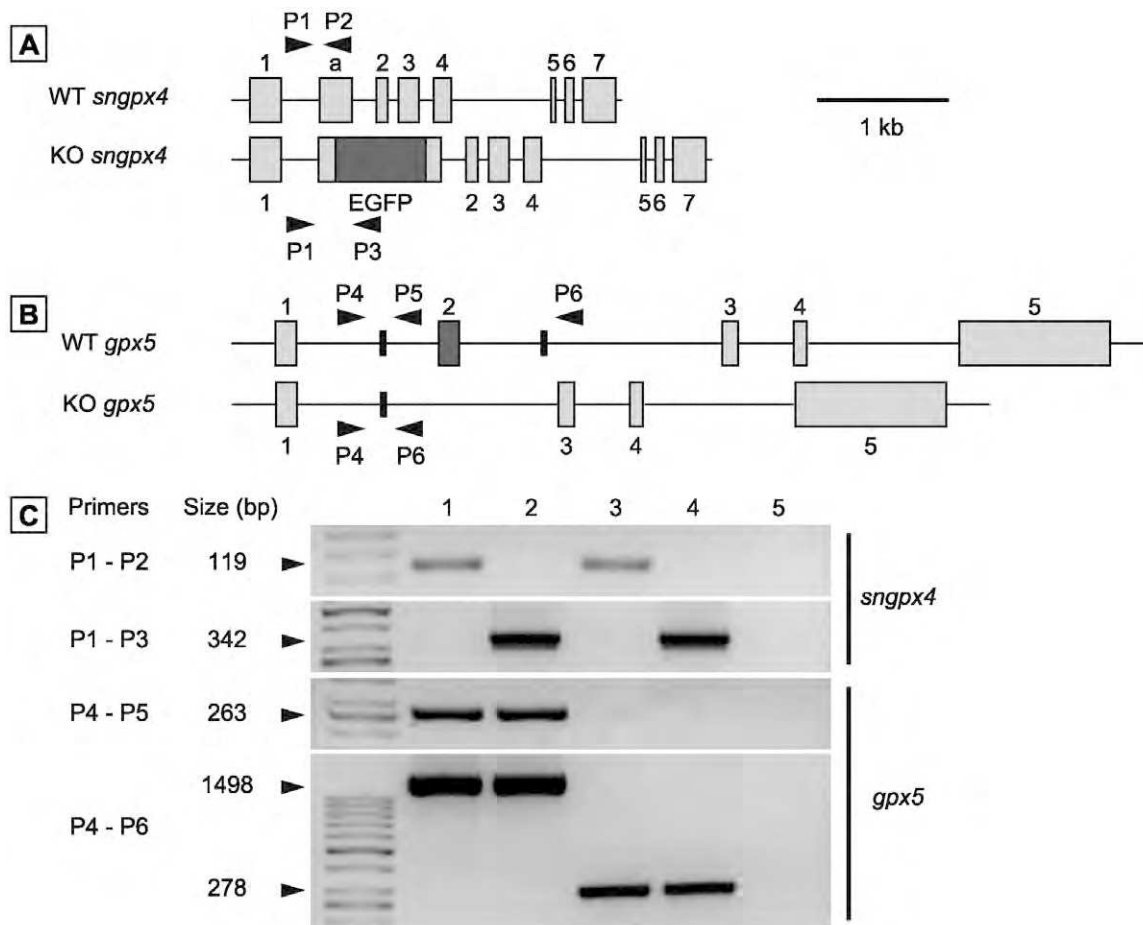


Figure 1. Generation of *snGPx4;GPx5*-deficient mice. A and B: Diagrammatic representations of mouse *GPx4* (A) and *GPx5* (B) gene organization (upper diagrams in A and B) and of their engineered version found in the single KO animals (lower schemes in A and B) (1, 20). Transgenic *snGPx4*^{-/-} animals bear an EGFP reporter cassette (20), while transgenic *GPx5*^{-/-} animals carry a deleted exon 2 (1). Grey boxes (1,a and 2 to 7 for *snGPx4* and 1 to 5 for *GPx5*) indicate the 8 or 5 coding exons, respectively. Bold arrowheads indicate the relative positions of the various primers used thereafter in genotyping PCR amplifications. C: Typical PCR experiments carried out on genomic DNA extracted from animal fingers used to select homozygous *snGPx4;GPx5*^{-/-} (DKO) animals. Size (in bp) of the expected PCR products for each primer pair used is given in the left margin. The two upper panels show *snGPx4* amplifications, while the two lower panels show *GPx5* amplifications. Lane 4 (DKO) stands for double knock-out animals, while lane 5 is a negative control in which no genomic DNA was added to the reactions. Primer sequences are given in Table 2. Lanes 1, 2 and 3 are positive control amplifications carried out with genomic DNA from wild type, homozygous *snGPx4*^{-/-} and homozygous *GPx5*^{-/-} animals, respectively. doi:10.1371/journal.pone.0038565.g001

high ROS-recycling metabolism. It is also important to note that, in the double mutant animals, the epididymis but not the liver was engaged in this global antioxidant response. As a result, the content in malonyldialdehyde (MDA), an end-point marker of lipid peroxidation, was significantly lower in spermatozoa of double mutant animals when compared to WT (Figure 6B). In caput and cauda tissue extracts, the MDA content was similar when WT samples were compared to KO samples. This suggests that the surmountable protection against lipid peroxidation engaged by the cauda epididymis was of a secreted nature or already present in the vicinity or on the sperm cell itself.

Both H₂O₂ Scavengers and Disulfide Isomerases are Up-regulated in the Epididymis of the Double Mutant Animals

To determine which ROS-recycling enzyme(s) and disulfide-bridging enzyme(s) were up-regulated in the epididymis of the double mutant animals, we used qRT-PCR to monitor the expression of various genes encoding these classes of proteins (see

Table 1) in the caput and cauda epididymidis compartments of WT and double mutant male mice. Concerning ROS-recycling enzymes (ROS-scavengers) we found that overexpression of the classical cauda epithelial GPxs (ie. GPx1, GPx3 and the cellular isoform of GPx4 [cGPx4]) as well as catalase, all being cytosolic enzymes, were not responsible for the extra scavenging capacity of this territory in the double mutant animals. Surprisingly, we even recorded a decrease in the expression of these classical H₂O₂- or/ and LOOH-recycling GPx genes both in the caput and cauda territories of the double mutant animals compared to WT. The extra H₂O₂ (or LOOH) recycling/consuming activities switched on in the epididymis of the double mutant animals were therefore not of the classical GPx/Catalase types. Rather, glutathione S transferases (GSTμ and GSTπ), a peroxiredoxin (PRDX3) and thioredoxin/thioredoxin-like genes such as TXN1 and TXN1L were found up-regulated in the epididymis of the double mutant animals. We recorded some regional differences in the overexpression of these ROS-recycling activities since TXN1L overexpression appeared to be a caput-restricted response while TXN1 and PRDX3 overexpression were recorded solely in the cauda

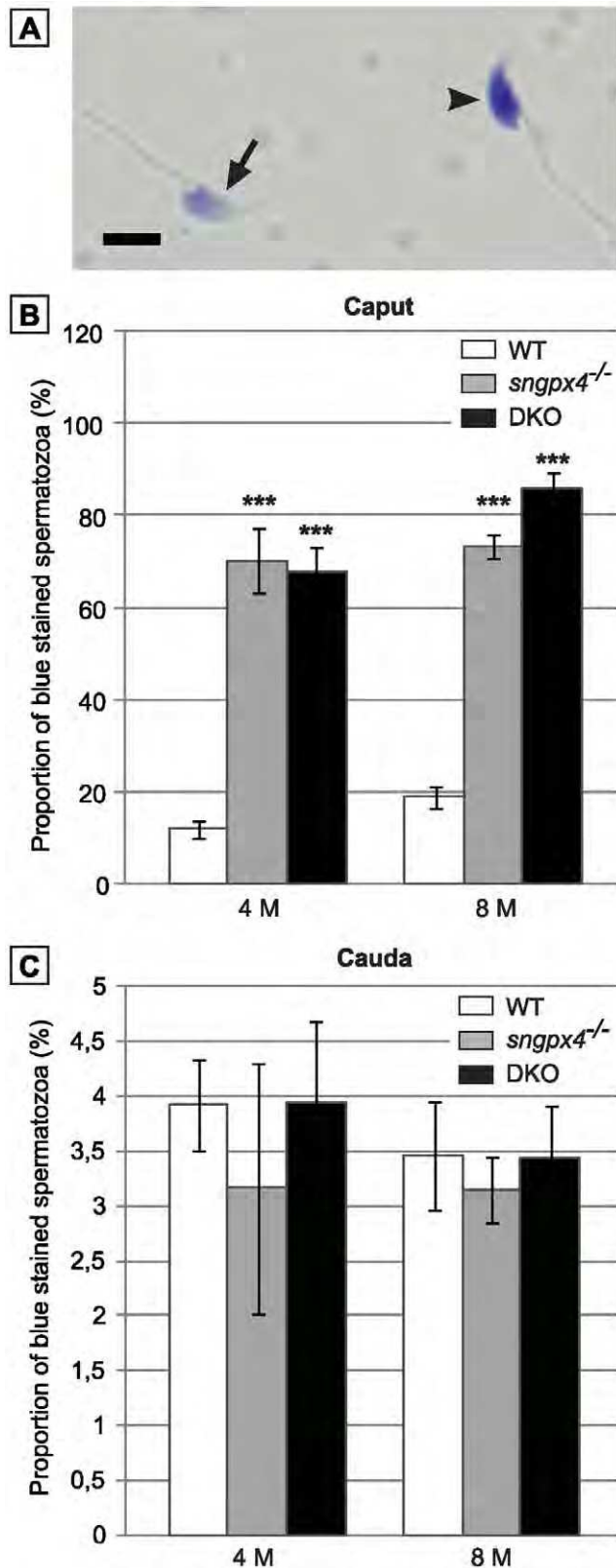


Figure 2. Evaluation of sperm DNA condensation using toluidine blue staining. A: The photograph shows a typical result of toluidine blue staining on a decondensed caput sperm DNA (arrowhead) compared to a condensed caput sperm DNA (arrow). Scale bar=5 μ m. B and C: Histograms plotting the proportion of decondensed sperm nucleus found in WT, *sngpx4*^{-/-} and DKO caput sperm

population (B) and cauda sperm population (C) in animals aged 4 or 8 months. (Mean \pm SEM; n=5; ***: $p \leq 0.001$ compared to WT). doi:10.1371/journal.pone.0038565.g002

territory. Regarding the response of the epididymis in terms of disulfide-bridging activities, we monitored the expression of several classical disulfide isomerases and we show in Table 1 that PDIA3 (ERP57), PDIA5, PDIA6 (TXNDC7), PDIA10 (ERP44/TXNDC4) and PDIA11 (TXNDC1) were up-regulated in caput and/or cauda tissue samples of the double mutant animals compared to WT.

Spermatozoa of Double Mutant Animals Show Increased DNA Fragmentation associated with DNA Oxidative Damage

Based on a modified method of the classical sperm chromatin dispersion assay (SCDA, [28]) Figure 7A illustrates that cauda spermatozoa of double mutant animals presented a higher level of DNA fragmentation than WT spermatozoa at the same ages. Figure 7B also shows that for double mutant animals aged 4 months the level of sperm DNA oxidative damage was well controlled by the epididymis antioxidant response since cauda spermatozoa were as reactive to an 8 oxo-dG antibody as WT spermatozoa. However, the situation was rather different with spermatozoa collected from older double mutant animals (8 months) where a high proportion of spermatozoa revealed oxidized guanine residues typical of DNA oxidative alterations. Figure 7C shows that this weaker protection of cauda collected spermatozoa in older animals was probably due to a general physiological decrease in the cauda epididymidis antioxidant response since we show that at this age (8 months), global H_2O_2 /LOOH-recycling activity was reduced by 2.5-fold both in WT and double mutant cauda epididymidis protein extracts compared to the situation in animals aged 4 months.

The Epididymis Antioxidant Response in the Double Mutant is Sufficient to Preserve Fertility

To investigate the effect of the absence of snGPx4 and epididymal GPx5 expression on male fertility, mice of both genotypes (*wt* and *sngpx4;gpx5*^{-/-}) were mated with *wt* female C57Bl/6 mice. Mating was conducted with animals at optimal reproductive age (3 months). No changes in mating behaviour were noticed. Three-month old double mutant male mice were found fertile with litter sizes (pups 8.00 ± 0.52 , n=6) comparable to those of WT mice at the same age (pups 8.17 ± 0.48 , n=6) (Figure 8A). More crosses were carried out with older male mice and *wt* young females to determine if the absence of both GPx had a greater effect after aging. Figure 8A shows that in males up to 17 months of age there were no statistically significant differences in litter sizes between *sngpx4;gpx5*^{-/-} and WT backgrounds. Time to gestation was also monitored and found to be comparable to that of WT crosses (Fig. 8B). Number of dead pups and perinatal mortality were monitored for each cross and found to be statistically comparable in WT and double mutant animals (Fig. 8C).

Discussion

We and other authors, have already proposed that sperm nuclear compaction is enhanced during epididymal descent by the combined actions of the snGPx4 disulfide isomerase and the luminal epididymal GPx5 scavenger that control H_2O_2 (or LOOH) availability, therefore determining the level of disulfide-bridging events on thiol-containing sperm protamines [24–27].

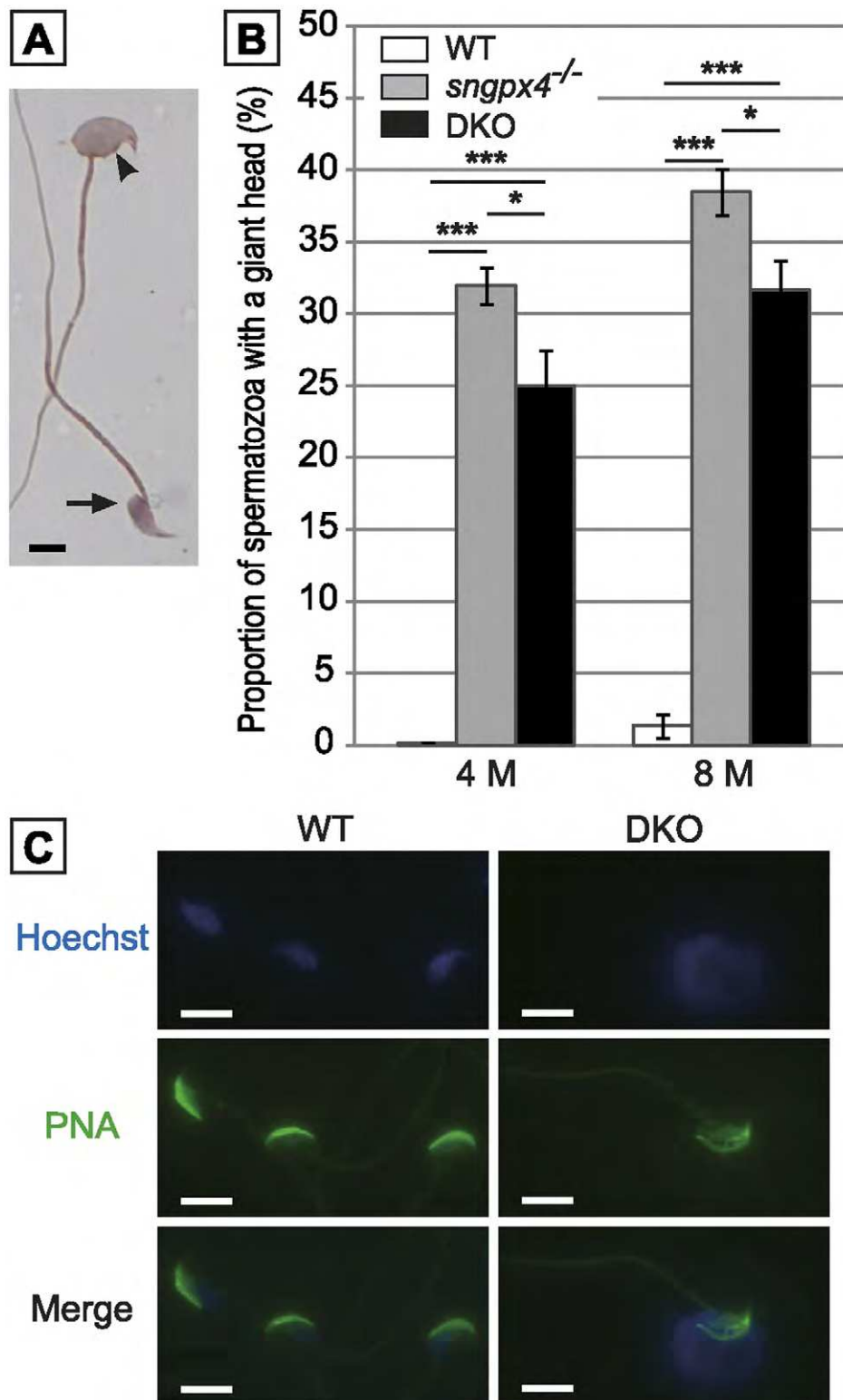


Figure 3. Morphological evaluation of caput sperm heads using Schorr staining. A: Photograph shows sperm head morphology with (arrowhead) or without (arrow) alterations found in caput epididymidis. Scale bar = 5 μ m. B: Histograms plotting the proportion of caput sperm showing a giant head phenotype in WT, *sngpx4*^{-/-} and DKO animals aged 4 or 8 months. (Mean \pm SEM; n = 5; ***, p \leq 0.001 compared to WT) C: Micrographs show WT (left panels) and DKO (right panels) caput spermatozoa stained either with Hoechst to localize the nucleus compartment (upper panels) or with PNA-Alexa488 to visualize the acrosome compartment (median panels). PNA-Alexa488 and Hoechst stains are merged on the lower panels. Scale bar = 5 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0038565.g003

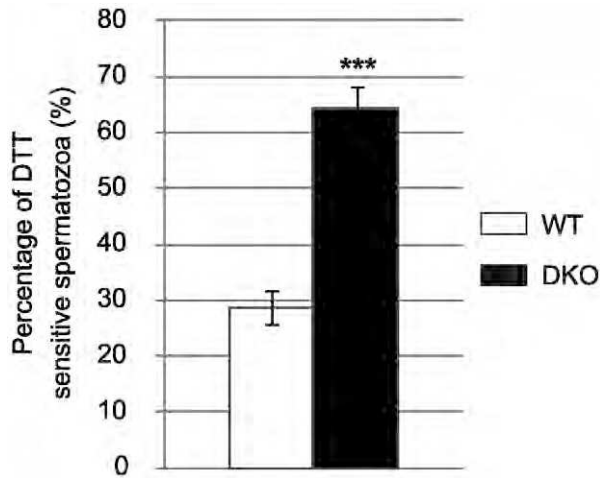


Figure 4. DKO cauda spermatozoa fragility. Histograms showing the proportion of WT and DKO cauda spermatozoa with a giant head phenotype after treatment of the sperm preparations with 2 mM DTT. (Mean \pm SEM; $n=5$; ***: $p \leq 0.001$ compared to WT). doi:10.1371/journal.pone.0038565.g004

We report here on the generation of a mouse strain in which both GPxs (snGPx4 and GPx5) were invalidated. In agreement with the tissue- and cell-restricted expression of both genes, and similarly to each single knock-out, lack of snGPx4 and GPx5 expression has no impact on animal viability. Using light microscopy, we recorded no difference in the organization and cytology of epididymal and testicular tissues of the double mutant animals when compared to WT animals (not illustrated). In addition, sperm cell number and sperm cell viability were found to be identical to those of control animals regardless of age. Since we expected from the respective single knock-outs [25,26] that spermatozoa from the double mutant animals would present nuclear structural defects, we focused our investigation on caput and cauda spermatozoa of the double mutants. We first show that already at 4 months of age and as early as in the caput territory about 80% of double mutant spermatozoa are concerned by nuclear decompaction. Compared to the single *gpx5*^{-/-} model, the situation in the double mutant is rather different since caput sperm of *gpx5*^{-/-} animals showed increased nuclear compaction attributed to a higher availability of H₂O₂/LOOH for the disulfide bridging activity of the snGPx4 enzyme [26]. The situation is however identical to that of caput spermatozoa of the single *sngpx4*^{-/-} strain at the same age as reported earlier by Conrad et al (2005) [25]. These data suggest that in the caput territory of the double mutant animals, lack of GPx5 activity does not worsen the state of sperm nuclear compaction observed in the single *sngpx4*^{-/-} model [24]. Alternatively, it may also indicate that defective GPx5 ROS-scavenging function has been compensated by other means in the double mutant animals. This is supported by our observations that several enzymatic scavengers are up-regulated both in the caput and the cauda epididymis of the double mutant animals compared to WT controls.

The nuclear decompaction we observed in caput-collected sperm of the double mutants was found to be transient since an apparently normal WT-like nuclear compaction was seen in cauda sperm, a situation also reported earlier for the snGPx4 KO [24,29]. We show here that low caput sperm nuclear compaction was associated with a giant-head phenotype affecting one third of the caput sperm population. We also show that this giant-head sperm phenotype is correlated with

nuclear decondensation. Sperm nuclear instability in the double mutant was not due to defective protamination or to decreased disulfide-bridging. On the contrary, for the latter, despite the absence of the snGPx4 disulfide isomerase activity, total sperm disulfide content was significantly greater in double mutants than in control WT animals, especially in the caput compartment. This observation again supports the idea that other activities, probably disulfide isomerases, have been switched-on to compensate for the absence of snGPx4 during spermatozoa epididymal transit in the double mutant animals. In agreement with this hypothesis we found that several protein disulfide isomerases or PDI-related proteins were up-regulated both in the caput and in the cauda compartments of the double mutant animals. Namely, PDIA3 (ERP57), PDIA5, PDIA6 (TXNDC7), PDIA10 (TXNDC4/ERP44) a PDI-chaperone protein which was shown to be involved in the control of oxidative protein folding [30] and PDIA11 (TCXNDC1), were found significantly up-regulated in the epididymis of the double mutant animals. These protein disulfide isomerases are already known to be expressed at significant levels in the mouse epididymis [31]. In particular, PDIA5 over-expression in the epididymis of the double mutant animals could be a logical response of the tissue to the absence of the caput active snGPx4 because PDIA5 was reported to be preferentially expressed in the distal caput epididymis [31]. Although the increase in protein disulfide isomerase expression allowed recovery of a normal nuclear compaction state in cauda-stored spermatozoa of double mutant animals we show here that the nucleus of these spermatozoa still remained fragile when challenged by a reducing agent such as DTT. DTT treatment of spermatozoa provoked the reappearance of the giant-head phenotype in two-third of the cauda sperm population in 4 month-old double mutant animals, while only 25% of WT cauda-stored spermatozoa were reactive to this treatment. As in the caput compartment of double mutants, the giant-head phenotype of cauda spermatozoa was shown to be associated with nuclear decondensation. These data are in agreement with a very recent report on *sngpx4*^{-/-} sperm nuclei which were also found to be susceptible to provoked decondensation [29]. Therefore, despite higher disulfide-bridging events due to the increase in protein disulfide isomerase expression along the epididymal tubule of the double mutant animals, sperm nuclei did not reach its WT-type-like optimal condensed state. This may be related to the inability of these induced disulfide isomerases to work in the sperm nucleus. In addition, it is also possible that cauda sperm DNA instability in the double mutant results from an increase in ROS-mediated DNA alterations (from DNA oxidation to DNA breaks) due to the pro-oxidant environment (i.e., because of the lack of GPx5). This would be comparable to the cauda sperm phenotype reported earlier in the single GPx5 KO [26]. Our data reinforces the idea that an optimal epididymal disulfide cross-linking activity is important to “shield” sperm nucleus against ROS-induced DNA damage. The duality of the situation is that the epididymis uses H₂O₂/LOOH to promote sperm-nucleus GPx4 disulfide isomerase activity even though spermatozoa are particularly sensitive to ROS. One explanation may reside in the fact that only a permeant agent such as H₂O₂ has the ability to reach the already quite condensed sperm nucleus compartment.

Concerning the antioxidant response of the epididymis in the double mutant, we show here that there was a large increase in H₂O₂-scavenging activity especially in the cauda epididymis of the double mutant. Total H₂O₂-recycling capacity in the cauda epididymis of the double KO animals was such that it reached

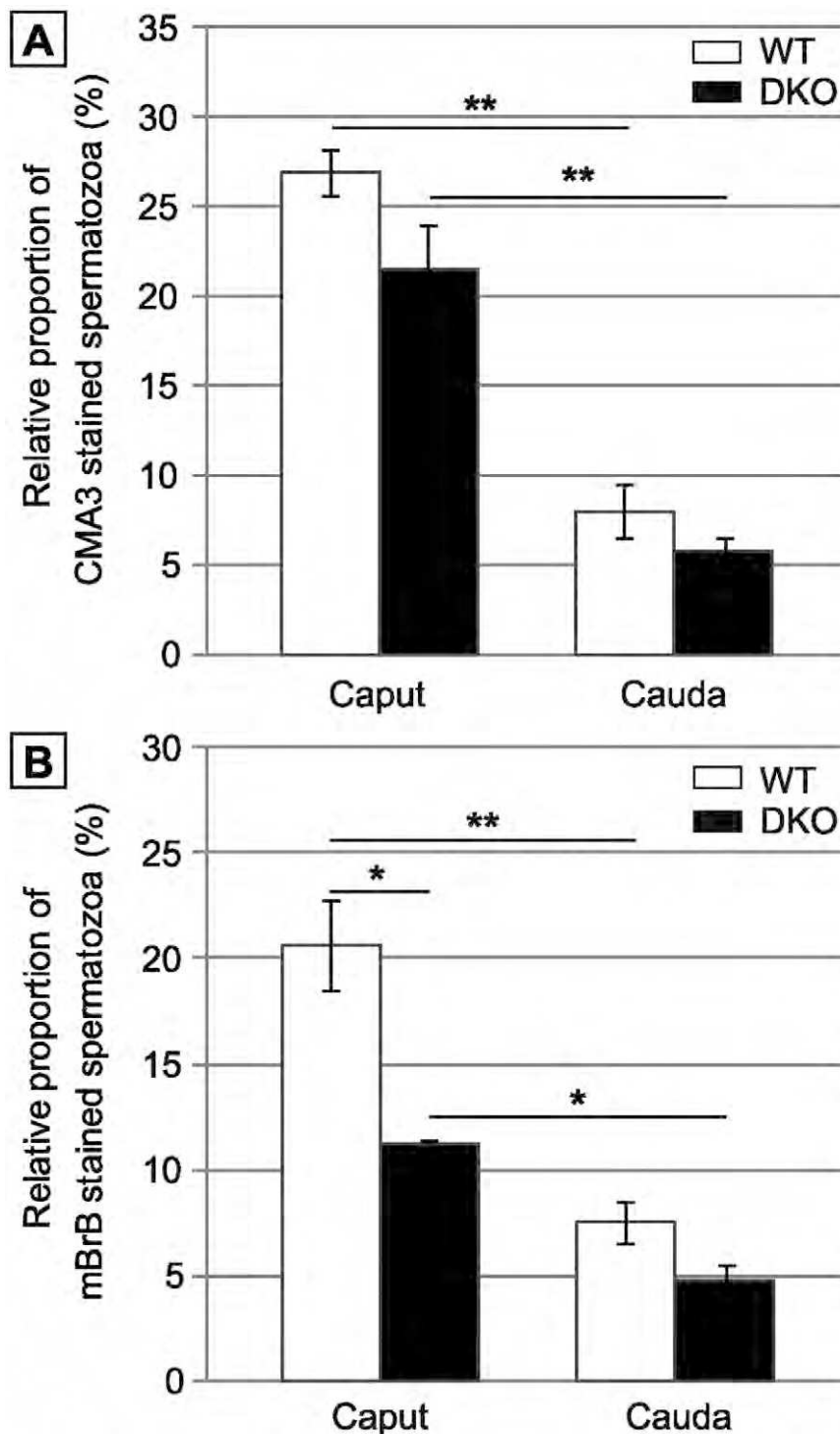


Figure 5. Evaluation of spermatozoa integrity by flow cytometry. A: Protamine association with sperm chromatin determined by chromomycin A3 (CMA3) staining. Histograms show the proportion of CMA3 incorporated in caput and cauda sperm of WT versus DKO animals aged 4 months. B: Disulfide bonds/free thiol quantification by monobromobimane (mBrB) staining. Histograms showing the incorporation of mBrB in caput and cauda sperm of WT versus DKO animals aged 4 months. (Mean \pm SEM; $n = 6$; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$). doi:10.1371/journal.pone.0038565.g005

and even exceeded the H_2O_2 -scavenging activity recorded in liver, a tissue that has a considerable H_2O_2 -recycling coverage because of its high detoxification metabolism. In comparison, global GPx-like activity in cauda epididymidis extracts of the single GPx5 KO animals was reported earlier to be identical to

that of the WT controls [26]. Interestingly, in the earlier model, the maintenance of normal H_2O_2 -scavenging activity in the cauda epididymis was shown to be due to the transcriptional up-regulation of the epithelial cytosolic GPxs (GPx1, GPx3 and cGPx4) as well as catalase [26]. We show here that the adaptive

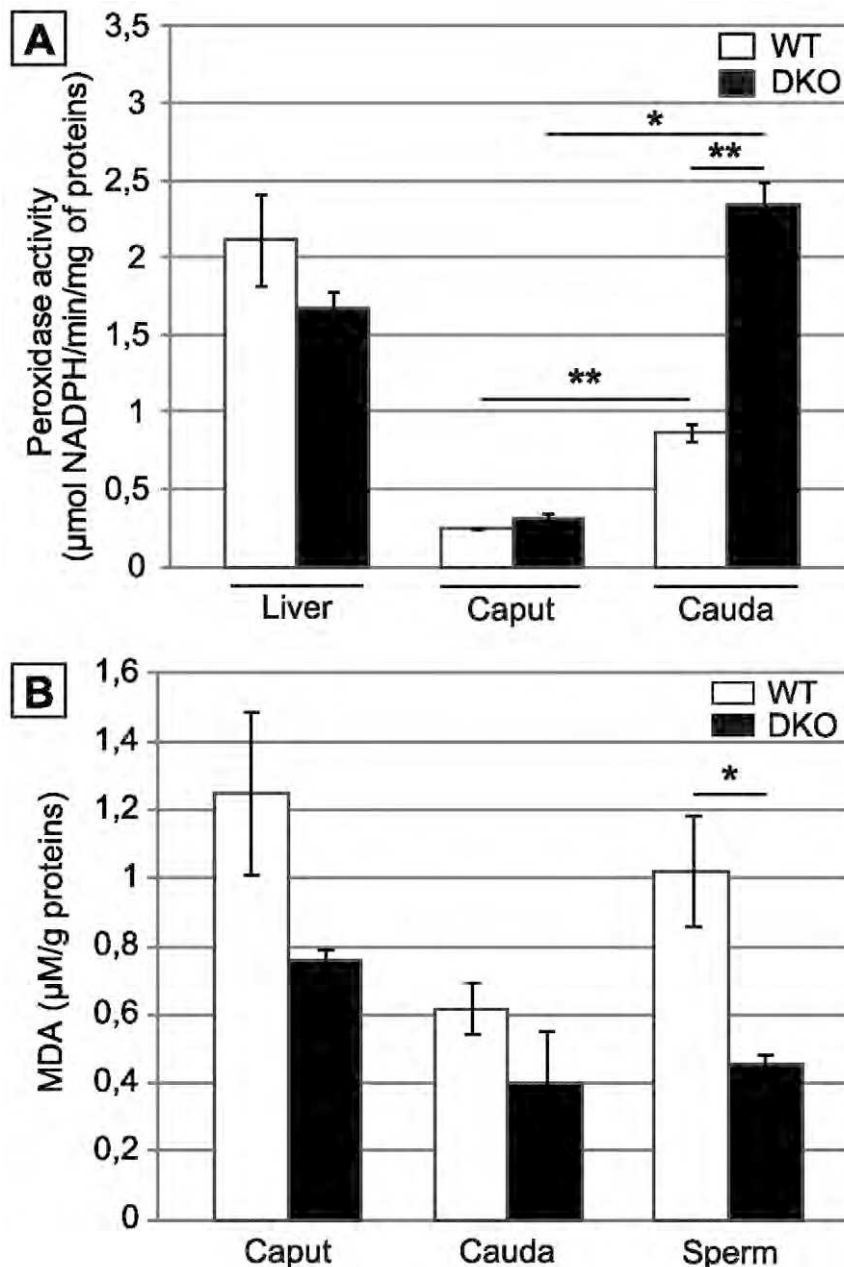


Figure 6. snGPx4;GPx5 deficiency leads to a strong epididymis anti-oxidant response. A: Histograms show global H_2O_2 -scavenging activity using H_2O_2 as a substrate in caput or cauda epididymis tissue extracts from WT or DKO animals aged 4 months. To evaluate the extent of the epididymis anti-oxidant response global H_2O_2 -scavenging activity in liver extracts of the same animals are shown on the left. (Mean \pm SEM; $n=5$; **: $p \leq 0.01$ compared to WT) B: Malondialdehyde (MDA) measurements on caput and cauda epididymal tissues as well as on cauda-collected spermatozoa from WT and DKO animals aged 4 months. (Mean \pm SEM; $n=3$; *: $p \leq 0.05$ compared to WT). doi:10.1371/journal.pone.0038565.g006

response of the epididymis in double mutant animals was different, because neither the cytosolic epithelial epididymal GPxs nor catalase were found to be transcriptionally up-regulated. On the contrary, compared to control animals, accumulations of epididymal GPx transcripts and to a lesser extend catalase transcripts were significantly lower in the caput and cauda compartments of the double mutants. This behavior may be comparable with recent reports which have shown that prolonged/chronic ROS exposure contributes to the down-regulation of GPx or catalase expression (for example see [32]). SOD3 expression was also found to be significantly reduced in

the cauda epididymis territory of the double mutant animals. Since extracellular SOD activity contributes to the generation of luminal H_2O_2 , it is possible that down-regulation of SOD3 expression is another method by which the epididymis of the double mutant animals regulates accumulation of this ROS around stored spermatozoa. These observations suggest that H_2O_2 -recycling in the epididymis of the double mutant animals is ensured by other enzymes. In agreement with this hypothesis, we found that several scavengers were transcriptionally up-regulated in the caput and cauda epididymidis compartments of the double mutant, including thioredoxins (TRX)/thioredoxin-

Table 1. Evaluation of the expression of various ROS-scavenger and disulfide isomerase genes using real-time PCR on tissue extracts of caput and cauda epididymidis from WT and DKO animals aged 4 months.

Gene	Caput		Cauda	
	Significance	Fold	Significance	Fold
<i>gpx1</i>	*	−1,52	=	=
<i>gpx3</i>		=		=
<i>gpx4</i>	**	−1,84	p = 0,0635	−2,07
<i>catalase</i>	*	−1,35		=
<i>sod3</i>		=	*	−3,36
<i>prdx1</i>		=		=
<i>prdx2</i>		=		=
<i>prdx3</i>		=	**	+1,79
<i>prdx4</i>		=		=
<i>prdx5</i>		=		=
<i>prdx6</i>		=		=
<i>txn1</i>		=	*	+1,47
<i>txn2</i>		=		=
<i>txn1l</i>	**	+1,26		=
<i>txndc2 (sptrx1)</i>		=		=
<i>txndc3 (sptrx2)</i>		=		=
<i>txndc8 (sptrx3)</i>		=		=
<i>gst μ</i>	*	+1,34	p = 0,0556	+1,37
<i>gst π</i>	*	+1,38	p = 0,0556	+1,36
<i>pdia3 (erp57)</i>		=	*	+1,56
<i>pdia4 (erp72)</i>		=		=
<i>pdia5</i>	p = 0,0556	+1,28	*	+1,44
<i>pdia6 (txndc7)</i>	**	+1,36	p = 0,0556	+1,15
<i>pdia10 (txndc4)</i>	**	+1,31	**	+1,3
<i>pdia11 (txndc1)</i>		=	*	+1,22

For each gene, the change in its expression in DKO versus WT male mice is indicated by + or − symbols, followed by the fold between the WT and DKO gene expressions (= : not significantly different; + : increased; − : decreased; n = 5; *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01).

doi:10.1371/journal.pone.0038565.t001

like proteins such as TXN1 and TXNL1 as well as a peroxiredoxin (PRX), PRDX3. The thioredoxin/peroxiredoxin (TRX/PRX) couple is the prevalent redox system occurring in a wide variety of tissues and cells [33,34]. Some PRX have been shown to be more efficient in neutralizing H₂O₂ than catalase and the glutathione/glutathione peroxidase (GSH/GPx) system [35,36]. It has also been reported that they are regenerated a lot faster than other redox proteins [37]. PRDX3 is a mitochondrial peroxidase that was shown in a different context, the eye lens epithelia, to be highly and specifically induced by low levels of H₂O₂ and as such, is considered as a gene acutely responsive to increased H₂O₂ levels [38]. Expression of PRX proteins throughout the mouse epididymis was reported earlier and PRDX3 is, together with PRDX1, PRDX5 and PRDX6, significantly expressed in the caput and cauda compartments [31]. Our analysis shows that only PRDX3, but not the other epididymis-expressed PRDXs, is up-regulated in the cauda territory of double mutant animals. Concerning thioredoxins, TXN1 was also reported to be significantly expressed throughout

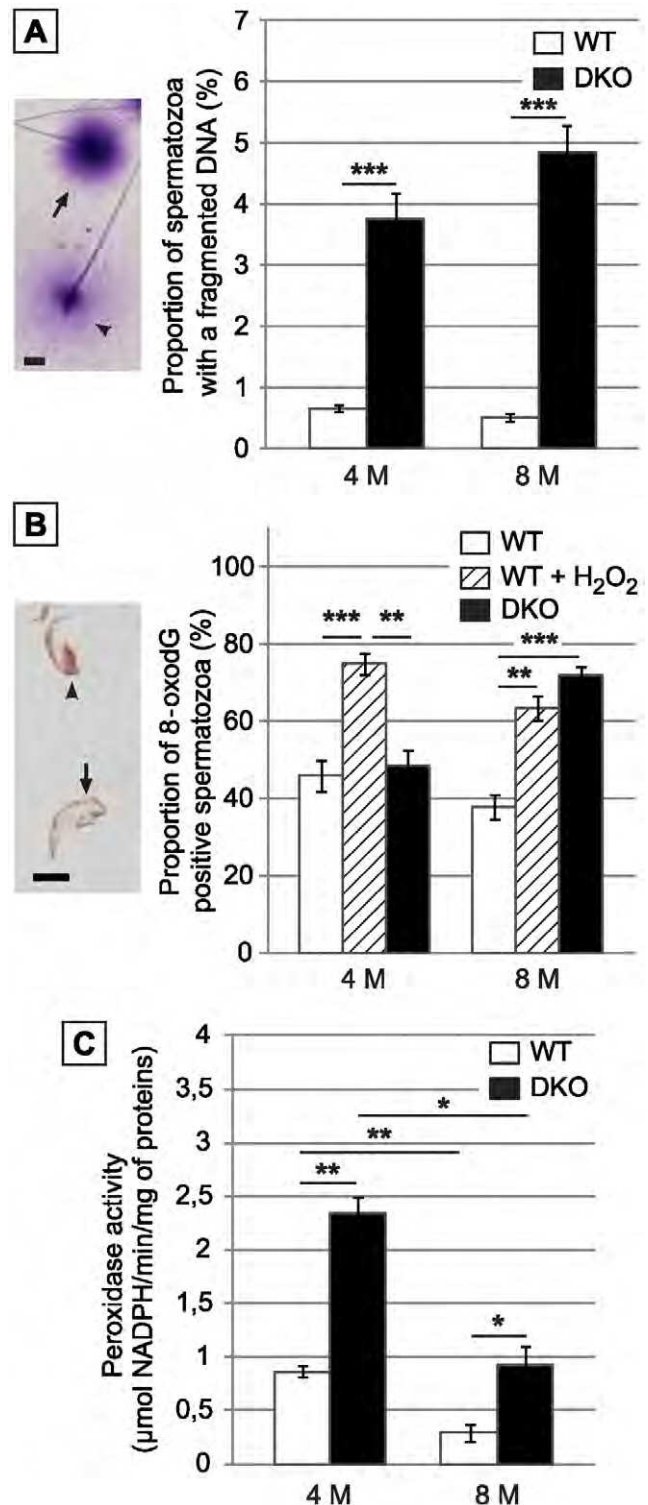


Figure 7. Cauda-retrieved spermatozoa of DKO animals suffer oxidative damage. A: Left panel: Typical picture of fragmented (arrowhead) or non-fragmented (arrow) sperm nucleus as shown by the modified Sperm Chromatin Dispersion Assay. Scale bar = 5 μm. Right panel: Histograms show the proportion of WT and DKO cauda collected spermatozoa with a fragmented DNA in animals aged 4 or 8 months. B: Left panel: Typical immunodetection of the nuclear adduct 8-oxodG in cauda epididymidis-retrieved spermatozoa preparations from DKO male mice aged 8 months. Scale bar = 5 μm. Right panel: Histograms show the percentage of 8-oxodG positive spermatozoa in cauda epididymi-

dis-retrieved spermatozoa preparations, respectively from WT, positive control (WT spermatozoa treated with H_2O_2) and DKO male mice aged 4 and 8 months. (Mean \pm SEM; $n=5$; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$). C: Histograms show global H_2O_2 -scavenging activity using H_2O_2 as a substrate in cauda epididymidis tissue extracts from WT or DKO animals aged 4 or 8 months. (Mean \pm SEM; $n=5$; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$).
doi:10.1371/journal.pone.0038565.g007

the epididymis [31], while TXNL1 was found to be weakly expressed in that tissue [31]. Because of the low profile of the glutathione system in the epididymis, it would not be surprising that the TRX/PRX system may play a significant role in eliminating excess H_2O_2 in that compartment. The role of thioredoxin as electron donor in the epididymis has already been proposed when we showed earlier, that GPx5 is a selenium-

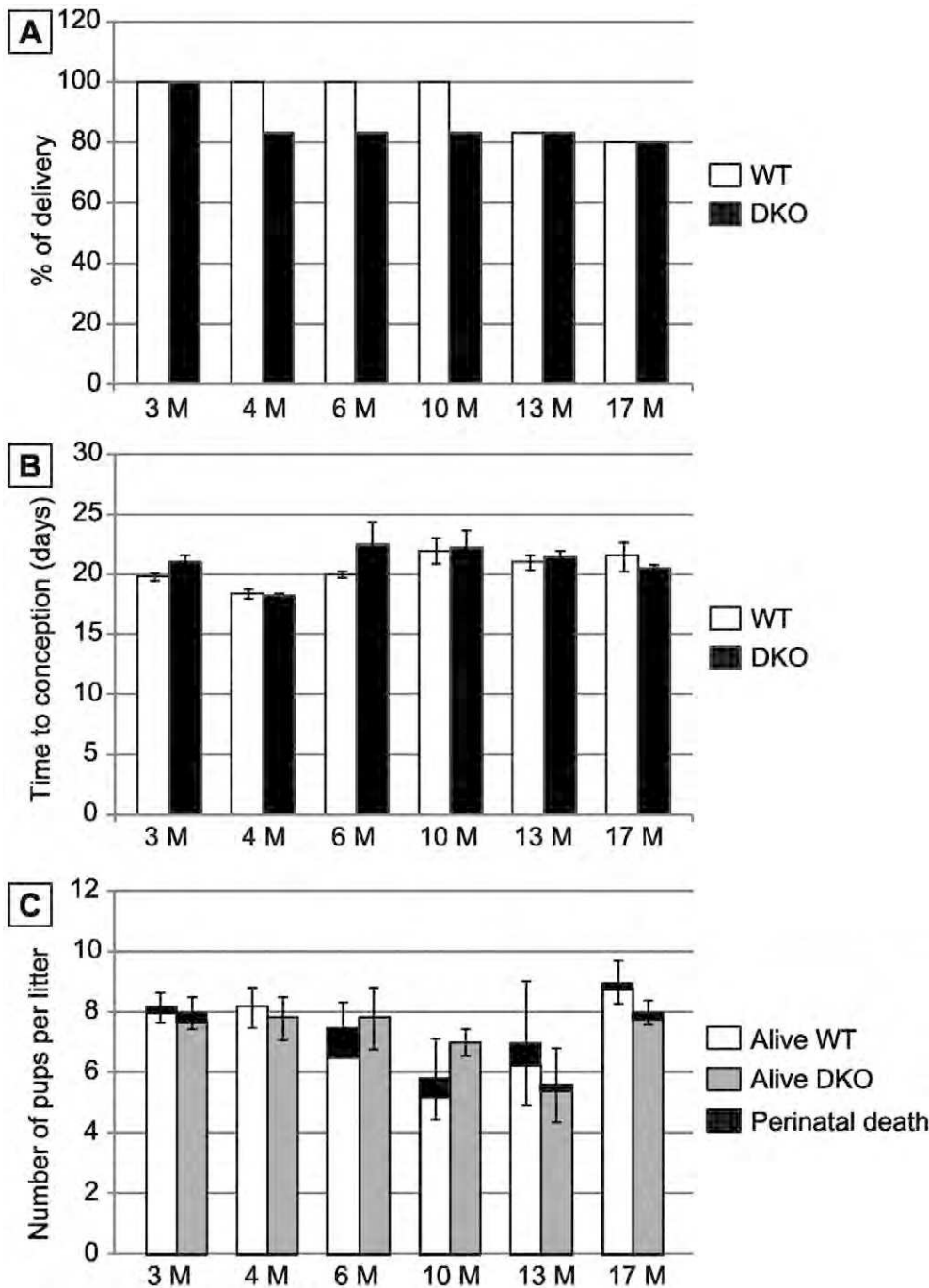


Figure 8. Impact of snGP4 and GPx5 deletions on mouse fertility. A: Histograms plotting the percentage of delivery of several matings between WT or DKO males and WT females (aged 3 months) according to male age given in months. B: Histograms plotting the delay to conception recorded in matings carried out with WT female mice (aged 3 months) and WT or DKO male mice aged 3 to 17 months. (Mean \pm SEM; $n=6$). C: Histograms plotting the number of pups per litter for WT or DKO males (open bars and grey bars, respectively) according to male age given in months. Black sections indicate the number of dead pups (perinatal mortality). (Mean \pm SEM; $n=6$).
doi:10.1371/journal.pone.0038565.g008

independent GPx of the 2-cyst-type that uses TRX rather than GSH as an electron donor [39–41]. Finally, together with thioredoxins and peroxiredoxin 3, we have found that glutathione-S-transferases (GST π and GST μ) are also significantly up-regulated both in the caput and cauda epididymidis compartments of the double mutant animals. This agrees with previous reports showing that GSTs are expressed at significant levels in mammalian epididymis [31,42]. Induced expression of multiple forms of GST appears to be an evolutionary response of cells to protect against chemical toxicity and oxidative stress. Therefore, induction of these enzymes in the epididymis of double mutants that lack antioxidant protection is not so surprising. It is interesting to note that different subsets of enzymes are up-regulated in the caput and the cauda compartments of double mutant animals compared to WT. The caput overexpresses TXNL1 and GSTs while the cauda overexpresses TXN1, PRDX3 and GSTs. This stronger antioxidant response of the cauda epididymidis of double mutant animals parallels the higher H₂O₂-recycling activity we have recorded in that part of the epididymis and indicates the TXN1/PRDX3 couple as the major contributor to this extra H₂O₂-recycling activity.

The ability of the epididymis to respond to oxidative stress even when a major luminal player (GPx5) has been invalidated shows the large capacity of this tissue to deal with ROS. It is interesting to note that the antioxidant response of the double mutant cauda epididymidis is sufficient to protect spermatozoa nucleus from oxidative damage in males aged 4 months, whereas it is not so in males aged 8 months. We provided a logical explanation for this observation since it follows the overall loss in cauda epididymidis antioxidant protection on aging as both WT and double mutant animals show an identical decrease in their global cauda H₂O₂-recycling capacity between 4 and 8 months of age. These observations indicate that adaptive responses of the epididymis are inefficient in older animals. Rescue provided by the epididymis antioxidant response in the double mutant context is partly sufficient to correct the deficiency in sperm nuclear disulfide bridging activity and sperm protection against oxidation. Our interpretation of the situation is that the epithelium antioxidant response attempts to counteract a H₂O₂/LOOH-rich luminal environment in order to protect itself. Spermatozoa do benefit from the epithelium antioxidant response because we have shown that cauda sperm of the double KO animals present a lower level of lipid peroxidation than WT spermatozoa. However, because sperm cells in the epididymal lumen cannot mount a stress response they suffer internal ROS-mediated damage such as DNA oxidation essentially because H₂O₂ can freely go into any cell compartment.

Thus, the epididymal rescue does not appear to be sufficient to completely protect paternal DNA from oxidative insults, hence the sensitivity to reducing condition that provokes nuclear decompaction, the higher level of DNA fragmentation and susceptibility to DNA oxidation upon aging found in cauda-stored spermatozoa of double mutant animals. Although it is likely that the oxidative insults of the sperm nucleus we recorded in the double KO animals occurred in the defective epididymal environment, we cannot at this stage rule out the idea that part of these sperm nuclear ROS-mediated damage start during late spermatogenesis when snGPx4 is normally associated with protamines. However, lack of GPx5 expression only affects the antioxidant capacity of the epididymis lumen (26) and snGPx4 was shown to perform its disulfide isomerase job on sperm protamines during their transit through the caput epididymis (24).

Of note is that the epididymis salvage in the double mutant, together with oocyte capacity to repair paternal DNA disorders,

are quite sufficient to maintain reproductive success, as double mutant males irrespective of their age were as fertile as WT males when naturally mated with young female mice. This emphasizes the plasticity and the ability of the epididymis to counteract excessive ROS-mediated sperm degradations. Investigations are in progress to determine whether subfertility is encountered in this model when using *in vitro* fertilization (IVF) which bypass female sperm selection processes [43,44]. Experiments are also conducted to determine whether or not subfertility is observed when using older oocytes which are known to have lost their optimal DNA repair capacity [45].

In conclusion, the epididymis of mice lacking expression of snGPx4 and GPx5 is able to trigger an antioxidant response and to increase disulfide isomerase expression to compensate for the absence of both proteins. Although antioxidant and disulfide-bridging activities are increased, they do not completely protect the cauda-stored spermatozoa and, particularly, its nuclear compartment that remains unstable, probably as a result of increased DNA oxidative insults. Our data emphasize that normal sperm nucleus condensation should not be considered as an absolute indicator of full nuclear integrity. Therefore, although MSOME (Motile Sperm Organellar Morphological Examination [46]) offers a powerful method to select morphologically normal spermatozoa for ICSI procedures, it is important to find new techniques that could be used in routine ART to evaluate sperm nuclear integrity prior to IVF and ICSI. This agrees with reports showing that a high sperm DNA Fragmentation Index (DFI) level has a marked effect on the success of implantation in ICSI cycles [47]. It is also in line with the recent suggestions that measurement of sperm DNA damage including oxidation level could be used as a predictor of ART outcome [48,49].

Materials & Methods

Animals-Ethics Statement

The present study was approved by the Regional Ethic Committee for Animal Experimentation (CEMEA-Auvergne; Authorization CE2-04) and adhered to the current legislation on animal experimentation in France. Wild type, *snGPx4*^{−/−}, and *snGPx4;GPx5*^{−/−} (DKO) C57bl/6 male mice either 4 or 8 months old were used throughout the study. Mice were housed under controlled environmental conditions (temperature 22°C, 12-h dark period), fed a basal diet (Global-diet, 2016S, Harlan, Gannat, France) *ad libitum*, and given free access to water. For fertility testing, 10-week old C57bl/6 females were used. All male mice were killed by cervical dislocation.

Genotyping of Mice by PCR

Genomic DNA was extracted from fingers by ethanol precipitation. Genomic DNA was PCR amplified in a final volume of 25 μ L in the presence of 2.5 mM MgCl₂, 400 μ M dNTPs, 400 nM of each primer and 1.25U GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) by running 2 independent PCR reactions for each gene as described previously [26]. The primers used in this study are described in the Table 2 and in Figure 1A–B.

Fertility Measurements and Spermatozoa Samples

Wt and *snGPx4;gpx5*^{−/−} male mice (five each), aged 3 to 17 months, were mated with one C57bl/6 *wt* synchronized female. At the end of the 7-day reproductive period, males were removed and females were observed to follow eventual pregnancies and deliveries. Time to conceive and number of pups per litter were monitored. For sperm preparations, mice were sacrificed. Epididymides were removed, divided into caput and caudal regions and

transferred to a small glass dish containing M2 medium (Sigma-Aldrich, France). To recover the spermatozoa, the caudae epididymides were repeatedly punctured with a needle. After 5 min incubation to allow for sperm dispersal, these preparations were centrifuged at 300 g for 5 min, and pellets were resuspended in phosphate buffered saline (PBS). Sperm counts were determined using a Malassez hemocytometer.

Cytochemical Tests for Sperm Integrity-Toluidine Blue

DNA compaction was studied by using the modified protocol of Conrad's group for Toluidine Blue staining [26], where spermatozoa were stained with 1% TB in McIlvain buffer (200 mM Na_2HPO_4 , 100 mM citric acid, pH 3.5) for 17 min at room temperature. Slides were dehydrated in ethanol and mounted with Cytoseal 60 medium. Three smears per sample were deposited on glass plates and at least 300 spermatozoa per smear were counted. *Shorr staining* – The sperm morphology was analyzed by Shorr staining [fixation in 70% (v/v) aqueous ethanol for 1 min; running water 2 min; Mayer's Hematoxylin (DiaPath) 3 min; running water 3 min; ammoniacal alcohol 10 s; running water 3 min; 70% ethanol 10 s; 95% ethanol 10 s; Shorr stain (Merck) 1 min; 95% ethanol 10 s; 100% ethanol twice for 10 s; Histo-Clear (National Diagnostics) 10 s; mounting with Richard-Allan Scientific® Cytoseal™ 60 medium (Electron Microscopy Sciences, USA)]. Three smears per sample were deposited on glass plates and at least 300 spermatozoa per smear were counted. *Acrosome and nucleus morphology*– Acrosome was labeled using lectin PNA Alexa Fluor® 488 conjugate (Invitrogen) and DNA was stained by Hoechst 33342 (Invitrogen). Air-dried smears of spermatozoa were hydrated in PBS and then incubated for 30 min in PBS, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PNA-Alexa 488 at 37°C in the dark. After 2 washes, slides were incubated in Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 5 min at room temperature, washed 3 times in PBS and mounted with PBS/glycerol (1:1).

Cytometry

Spermatozoa of caput or cauda epididymides were diluted with M2 medium to 10^6 sperms/ml. Flow cytometer evaluation was performed using a Calibur cytometer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). For each analysis, 10,000 events were counted using specific probes as described thereafter. Argon laser excitation at 488 nm was coupled with emission measurements at 530/30 (red) and 585/42 (green) band pass, respectively. Non-specific sperm events were gated out. The data were analysed with logiciel CellQuest Pro software (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Percentages of living and dead cells were assessed using propidium iodide (PI) (0.01 mg/ml, Sigma). PI was incubated with sperm cells for 8 min at 37°C, then cells were analysed by cytometry on FL3 channel (>650 nm). Sperm total thiol contents were determined using monobromobimane as a probe (mBrB [Thiolite], Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France). A 50 mM solution stock was diluted in 100% acetonitrile. Sperm cells were stained with 1 mM mBrB for 30 min at 25°C then washed twice with PBS. Free thiols were measured by fluorescence on FL1 channel (515–545 nm). To evaluate sperm chromatin condensation, sperm cells were stained with 0.25 mg/ml chromomycin A3 (CMA3, Sigma, France) for 20 min at 25°C. Sperm nuclei decondensation level was measured by cytometry on FL2 channel (564–606 nm).

Peroxidase Activity Assay

Analyses of peroxidase activity were performed as previously described [38] using hydrogen peroxide (200 μM) as a substrate

and glutathione (3 mM)/glutathione reductase (1.4 U). NADPH oxidation was monitored at 340 nm.

Lipid Peroxidation Assay

Lipid peroxidation (LPO) in the tissues was measured by thiobarbituric acid reacting substance (TBARS) and was expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content. Sample aliquots were incubated with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid. The mixture was heated in a boiling water bath for 30 min, an equal volume of n-butanol was added, and the final mixture was centrifuged; the organic phase was collected for fluorescence measurements. Samples assayed for MDA contained 1 mM butylated hydroxytoluene (BHT) in order to prevent artefactual LPO during the boiling step. The absorbance of samples was determined at 532 nm. Results were expressed as $\mu\text{mol MDA g}^{-1}$ protein.

Sperm DNA Fragmentation Assay

Assessment of sperm DNA fragmentation was carried out using the staining protocol of the Halomax kit (Chromacell, Spain), a modified Sperm Chromatin Dispersion Assay [28]. Four smears per sample were deposited on glass plates and at least 500 spermatozoa per smear were counted.

Evaluation of DNA Peroxidative Damages

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine detection (8-oxodG) was carried out on spermatozoa from cauda epididymidis. Spermatozoa were resuspended in a decondensing buffer consisting of 2 mM DTT and 0.5% Triton X-100 in PBS 1X and incubated for one hour at room temperature. After centrifugation at 300 g for 5 min at room temperature, spermatozoa were washed in PBS and smeared on a glass plate (30,000 cells/plate). WT and DKO spermatozoa were compared for their reactivity towards the 8-oxodG monoclonal antibody (15A3, Novus biological, Interchim, France). As a positive control of oxidative damage of sperm DNA, a WT spermatozoa aliquot was treated for 2 hours at room temperature by 0.02% H_2O_2 . Incubations with the primary antibody (dilution 1/500) were conducted overnight at 4°C. Then, after two washes in PBS 1X, Triton X-100 0.1%, the secondary antibody was applied for 1 hour at room temperature (dilution 1/500, anti-mouse IgG polyclonal coupled HRP, P.A.R.I.S Anticorps, France). Signal detection was obtained by the use of the Vector Nova Red substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories, AbCys, Paris, France). Two smears per sample were deposited on glass plates and at least 300 spermatozoa per smear were counted.

Microscopy

Observations and counts of Shorr staining, Toluidine blue staining and DNA fragmentation assay were made in transmitted light with the Axioskop (Carl Zeiss, Germany), using magnification of x400. 8-oxodG-positive spermatozoa were counted by Axio-plan2 imaging (Carl Zeiss, Germany) in transmitted light (magnification: x630). Observations of fluorescent probes were made by Axio-plan2 imaging (Carl Zeiss, Germany) at excitation and emission wavelengths: Alexa 488, BP 475/40 and BP 530/50; Hoechst 33342, BP 365/12 and LP 397, respectively (magnification: x1000).

Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Total RNAs were isolated with the NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel, France). Total RNAs were reverse transcribed by M-MLV Reverse Transcriptase (Promega Corp., France)

Table 2. Primer sequences used for genotyping of transgenic animals and real time PCR amplifications of selected thiol peroxidases and antioxidant-related genes.

Target	GenBank	5'-3' primers sequences	Size (bp)	Melting (°C)
Genotyping				
<i>sngpx4</i>	NC_000076.5	P1/F – TCGGCGGCGCCTTGGCTACCGGCTC P2/R – GGATCCGCCGCGCTGTCTGCAGCGTCCC P3/R – TGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGG	119 342	60
<i>gpx5</i>	NC_000079.5	P4/F – GTGTCTGAGAATCTAGTCCTAGC P5/R – GTGACAGTTTTCTCAGGGGTTGG P6/R – CTGCCTTGTGAAGGTTGACAGG	263 1498/278	60
q-PCR				
<i>cyclophilin B</i>	NM_011149.2	F – GGAGATGGCACAGGAGGAA R – GCCCGTAGTGCTTCAGCTT	76	57 à 62
<i>gpx1</i>	NM_008160.5	F – GTCCACCGTGTATGCCTTCT R – CTCCTGGTGTCCGAATGAT	217	62
<i>gpx3</i>	NM_008161.2	F – TCGGAGATACTCCCGAGTC R – AGTTCCAGCGGATGTCATGG	211	58
<i>gpx4</i>	NM_008162.2	F – AGTACAGGGGTTTCGTGTGC R – CGGCAGGTCCTTCTCTATCA	410	62
<i>Catalase</i>	NM_009804.2	F – GCAGATACCTGTGAAGTGTG R – GTAGAAATGTCCGCACCTGAG	229	62
<i>sod3</i>	NM_011435.3	F – GCTCTCAGAGAACCCTCT R – GTGCTATGGGGACAGGAAGA	170	58
<i>prdx1</i>	NM_011034.4	F – CAACTGCCAAGTGATTGGCG R – TGAGCAATGGTGCGCTTGGG	135	59
<i>prdx2</i>	NM_011563.5	F – TGACTTCACGGCCACAGCGG R – CGGAAGTCTCAGCATGGTC	159	61
<i>prdx3</i>	NM_007452.2	F – CAGACATACTGTGGTCTGCC R – AAGTCGTGAGACTCAGCTC	151	59
<i>prdx4</i>	NM_016764.4	F – CAGGACATACTCTTAGAGGCC R – TCACTACCAGGTTTCCAGCC	178	62
<i>prdx5</i>	NM_012021.2	F – CGTGCACTGACGTGCTTGGC R – ACCTCCACTGAGGGAATGGC	137	60
<i>prdx6</i>	NM_007453.3	F – CACAGAACTTGGCAGAGCTG R – TCGACTGGATCCAACATGCC	219	59
<i>txn1</i>	NM_011660.3	F – TGGTGAAGCTGATCGAGAGC R – GGAATACTTGTACAGAGGG	149	59
<i>txn2</i>	NM_019913.5	F – GGTGGTCATGGCCAAAGTGG R – CTTCTAGCTGGTCTCTGTC	146	61
<i>txn1l</i>	NM_016792.4	F – ACTGTGGCATTCAATCAGCC R – AGTTGGCTCACTCCTTCCG	144	57
<i>txndc2 (sptrx1)</i>	NM_001146002.1	F – GGAGCTCTGAAGAGTCGG R – GGCCTTCTCTTGGACTGGG	150	62
<i>txndc3 (sptrx2)</i>	NM_181591.3	F – CCCTGAAGAGGTAGTGAGGG R – GGTGCAAACCTAACGTGAGGC	207	59
<i>txndc8 (sptrx3)</i>	NM_026132.2	F – GTTGTCTCAGGTGGATGTGG R – CTTGCTCCACTTCTGAGGC	154	62
<i>gst μ</i>	NM_010358.5 NM_008183.3	F – GAAGTTCAAGCTGGGCCTGG R – GCATGATGAGCTGCATGCGG	194	59
<i>gst π</i>	NM_013541.1 NM_181796.2	F – AGCTTTTCATCGTGGTGACC R – GGGACGGTTCATGTTCCG	187	59
<i>pdia3 (erp57)</i>	NM_007952.2	F – GGACATTGCAAGAGCTTGCCC R – TAGGCCCATCATAAGCACCCGC	184	62
<i>pdia4 (erp72)</i>	NM_009787.2	F – TGATGGCTCCAGGACCCAGG R – TTGCTGAGCTCCTTGCCAGC	222	61
<i>pdia5</i>	NM_028295.1	F – TTTCCAGAAGGCTGCCACCC R – CTCCACGATGTCCTCGGCC	190	62
<i>pdia6 (txndc7)</i>	NM_027959.3	F – TGGAAGAAAGCAGCAACGGC R – CATCTACAATGGCTTCTCCC	184	57
<i>pdia10 (txndc4/erp44)</i>	NM_029572.2	F – CAGATTGCCCTGTCTATAGCC R – TGTGAGTCGGGTGACGTC	159	57

Table 2. Cont.

Target	GenBank	5'-3' primers sequences	Size (bp)	Melting (°C)
<i>pdia11 (txndc1)</i>	NM_028339.1	F – GCTTGTGCAATCTTCAGCC R – CACATAGCGCTAAATTCACC	174	60

For each gene studied are indicated the Genbank accession number of the sequences used to design primers, the primers sequences (forward: F; reverse: R), the fragment size and the annealing temperature.

doi:10.1371/journal.pone.0038565.t002

according to the manufacturer's instruction. Quantitative real time PCR assays were performed using a RealPlex thermocycler (Eppendorf). Two μ L of diluted cDNA template (1/20 caput epididymidis; 1/5 cauda epididymidis) were amplified using MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec, France) according to the manufacturer's instructions. Primer sequences are given in Table 2. A standard curve of amplification efficiency for each set of primers was generated with a serial dilution of plasmids containing DNA of targeted genes. Melting curve analysis was carried out to confirm the specificity of primers. For quantification of transcripts, the relative method was used to calculate mRNA relative level to *Cyclophilin B* standard.

Statistical Analysis

Kruskal-Wallis and *Mann-Whitney* nonparametric tests were performed with GraphPad Prism 5.02 software to determine the

significance of differences between samples. *P* values of ≤ 0.05 were regarded as significant.

Acknowledgments

We are indebted to Dr. Felicity Vear (Institut National de la Recherche Agronomique, Clermont-Ferrand, France) and Dr. Peter Ofner (Institut für Funktionelle Genomik Universität Regensburg, Germany) for English grammar and syntax corrections.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JRD AK FS RC PV MC. Performed the experiments: AN MP CDS EC NK AK. Analyzed the data: JRD AK IJ HPR MC. Contributed reagents/materials/analysis tools: MC. Wrote the paper: JRD AN AK.

References

- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T (1997) Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 68: 519–524.
- Spano M, Bonde JP, Hjøllund HL, Kolstad HA, Cordelli E, et al. (2000) Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 73: 43–50.
- Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT (2001) Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 75: 674–677.
- Tesarik J, Greco E, Mendoza C (2004) Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reprod* 19: 611–615.
- Lewis SEM, Aitken RJ (2005) DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 322: 33–41.
- O'Brien J, Zini A (2005) Sperm DNA integrity and male infertility. *Urology* 65: 16–22.
- Zini A, Libman J (2006) Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *Curr Opin Urol* 16(6): 428–434.
- Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C (2006) Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online* 12: 715–721.
- Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A (2007) Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol* 33: 603–621.
- Marchesi DE, Feng HL (2007) Current assessment of sperm DNA integrity. (2007) *Arch Androl* 53(5): 239–247.
- Aitken RJ, De Iulius GN, McLachlan RI (2008) Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 32: 46–56.
- Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, et al. (2005) DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 26: 741–748.
- Sakkas D, Alvarez JG (2009) Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 93: 1027–1036.
- Ward WS, Coffey DS (1991) DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44: 569–574.
- Miller D, Brinkworth M, Iles D (2010) Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139: 287–301.
- Calvin HI, Bedford JM (1971) Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil* 13: 65–75.
- Bedford JM, Calvin HI (1974) Changes in -S-S- linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species. *J Exp Zool* 187: 137–156.
- Shalgi R, Seligman J, Kosover NS (1989) Dynamic of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labelling agent monobromobimane. *Biol Reprod* 40: 1037–1045.
- Seligman J, Kosover NS, Weissenberg R, Shalgi R (1994) Thiol-disulfide status of human sperm proteins. *J. Reprod. Fertil* 101: 435–454.
- Balhorn R, Corzett M, Mazrimas J, Watkins B (2001) Identification of bull protamine disulfides. *Biochemistry* 30: 175–181.
- Yeung CH, Barfield JP, Cooper TG (2006) Physiological volume regulation by spermatozoa. *Mol cell Endocr* 250: 98–105.
- Huang HF, Nieschlag E (1984) Alteration of free sulphhydryl content of rat sperm heads by suppression of intratesticular testosterone. *J Reprod Fertil* 70: 31–38.
- Golan R, Cooper TG, Oschry Y, Oberpenning F, Schulze H, et al. (1996) Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Hum Reprod* 11: 1457–1462.
- Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kölle S, et al. (2005) The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol* 25: 7637–7644.
- Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, et al. (2001) Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J* 15: 1236–1238.
- Chabory E, Damon C, Lenoir A, Kauzelmann G, Kern H, et al. (2009) Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest* 119: 2074–2085.
- Nobla A, Kocer A, Chabory E, Vernet P, Saez F, et al. (2011) Glutathione peroxidases (GPx) at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. *J Androl* 32(6): 641–650.
- Fernandez JL, Muriel M, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, et al. (2003) The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 24: 59–66.
- Puglisi R, Maccari I, Pipolo S, Conrad M, Mangia F, et al. (2011) The nuclear form of glutathione peroxidase 4 is associated with sperm nuclear matrix and is required for proper paternal chromatin decondensation at fertilization. *J Cell Physiol*, [Epub ahead of print, doi:10.1002/jcp.22857]
- Anelli T, Alessio M, Mezghrani A, Simmen T, Talamo F, et al. (2002) Erp44, a novel endoplasmic reticulum folding assistant of the thioredoxin family. *EMBO J* 15(21): 835–844.
- Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, DiCandeloro P, Wilson E, et al. (2005) The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol Reprod* 73: 404–413.
- Quan X, Lim S, Jung G (2011) Reactive oxygen species downregulate catalase expression via methylation of a CpG Island in the Oct-1 promoter. *FEBS Lett* 585: 3436–3441.

33. Arner ES, Holmgren A (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267: 6102–6109.
34. Wood ZA, Schroder E, Robin-Harris J, Poole LB (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem* 28: 32–40.
35. Peskin AV, Low FM, Paton LN, Maghzal GJ, Hampton MB (2007) The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *J Biol Chem* 282: 11885–11892.
36. Berggren MI, Husbeck B, Samulitis B, Baker AF, Gallegos A, et al. (2001) Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Arch Biochem Biophys* 392: 103–109.
37. Chevallet M, Wagner E, Luche S, van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, et al. (2003) Regeneration of peroxiredoxins during recovery after oxidative stress: only some overoxidized peroxiredoxins can be reduced during recovery after oxidative stress. *J Biol Chem* 278: 37146–37153.
38. Lee W, Wells T, Kantorow M (2007) Localization and H₂O₂-specific induction of PRDX3 in the eye lens. *Mol Vis* 13: 1469–1474.
39. Herbette S, Lenne C, Leblanc N, Julien JL, Drevet JR, et al. (2002) Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *Eur J Biochem* 269: 2414–2420.
40. Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR (2007) Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J* 274: 2163–2180.
41. Flohe L, Toppe S, Cozza G, Ursini F (2011) A Comparison of Thiol Peroxidase Mechanisms. *Antioxidants & Redox Signaling* 15(3): 763–780.
42. Montiel EE, Huidobro CC, Castellon EA (2003) Glutathione-related enzymes in cell cultures from different regions of human epididymis. *Arch Androl* 49: 95–105.
43. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A (2008) Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 23(12): 2663–2668.
44. Satake N, Elliott RM, Watson PE, Holt W (2006) Sperm selection and competition in pigs may be mediated by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct. *J Exp Biol* 209: 1560–1572.
45. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Garcia-Herreo S, Remohi J, et al. (2011) Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril* 95(1): 124–128.
46. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Yagoda A, et al. (2003) Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 80(6): 1413–1419.
47. Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, Joshi R, Delhanty JD, et al. (2010) Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Hum Reprod* 25(7): 1609–1618.
48. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, et al. (2010) Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod* 25(7): 1594–1608.
49. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE (2011) Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcome. *Reprod Biomed Online* 23(6): 724–734.

Publication 4 : Article original

DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected?

A. Noblanc, C. Damon-Soubeyrand, B. Karrich, J. Henry-Berger, R. Cadet, F. Saez, R. Guiton, L. Janny, H. Pons-Rejraji, J.G. Alvarez, J.R. Drevet, A. Kocer

Free Radical Biology and Medicine, 2013, **65** : 719-723



Original Contribution

DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa:
where and why is the male nucleus affected?

Anais Noblanc^a, Christelle Damon-Soubeyrand^a, Bouchta Karrich^a, Joelle Henry-Berger^a, Rémi Cadet^a, Fabrice Saez^a, Rachel Guiton^a, Laurent Janny^{a,b}, Hanae Pons-Rejraji^{a,b}, Juan G. Alvarez^{c,d}, Joël R. Drevet^{a,*}, Ayhan Kocer^a

^a Genetic Reproduction and Development, CNRS UMR6293–INSERM U1103–Clermont Université, 63171 Aubière Cedex, France

^b CHU Estaing, Assistance Médicale à la Procréation, Clermont-Ferrand, France

^c Centro Androgen, La Coruña, Spain

^d Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 May 2013

Received in revised form

8 July 2013

Accepted 31 July 2013

Available online 13 August 2013

Keywords:

Sperm nuclear organization

Paternal DNA integrity

Free radicals

ABSTRACT

Gamete DNA integrity is one key parameter conditioning reproductive success as well as the quality of life for the offspring. In particular, damage to the male nucleus can have profound negative effects on the outcome of fertilization. Because of the absence of repair activity of the quiescent mature spermatozoa it is easily subjected to nuclear damage, of which oxidative damage is by far the most prominent. In relation to the organization of the mammalian sperm nucleus we show here that one can correlate the nuclear regions of lower compaction with areas preferentially showing oxidative damage. More precisely, we show that oxidative DNA damage targets primarily histone-rich and nuclear matrix-attached domains located in the peripheral and basal regions of the mouse sperm nucleus. These particular sperm DNA domains were recently shown to be enriched in genes of paramount importance in postfertilization DNA replication events and in the onset of the embryonic developmental program. We propose that monitoring of sperm DNA oxidation using the type of assay presented here should be considered in clinical practice when one wants to estimate the integrity of the paternal nucleus along with more classical assays that essentially analyze DNA fragmentation and nucleus compaction.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Oxidative damage of sperm DNA is a common feature found in infertile males regardless of whether the cause is genetic, metabolic, or environmental or a natural consequence of aging [1–5]. In addition, oxidative damage of sperm DNA is a major concern in assisted reproductive technologies (ART) because significant iatrogenic oxidative DNA damage may take place during sperm processing and sperm cryopreservation [6]. Although it is widely accepted that sperm oxidative DNA damage may interfere with the reproductive outcome of infertile couples [7] there is as yet no report characterizing this damage in more detail. Unlike the classical nuclear organization model of somatic cells, sperm DNA is packaged in one-tenth of the volume found in a somatic cell nucleus. This tight packaging takes place during spermiogenesis and is enabled by the replacement of the classical histones by the smaller, cysteine-rich protamines [8]. This sperm DNA compaction is further enhanced and stabilized during epididymal maturation via disulfide crosslinking of thiol-rich protamines [9,10]. These processes serve two main purposes: (i) to package the sperm

chromatin into the smallest possible volume and (ii) to make the paternal genome resilient to exogenous damage during migration of sperm from the seminiferous tubules to the oviduct. However, mammalian spermatozoa and, in particular, human spermatozoa, maintain part of their DNA in a more relaxed histone-bound nucleosomal configuration [10,11]. The current paradigm concerning sperm nuclear organization is that (i) retained histones are found interspersed at regular intervals between protamine toroid segments and (ii) histone-bound DNA is also found at nuclear matrix-attached domains (Fig. 1b), where, as suggested, it would facilitate postfertilization DNA replication events [12,13]. As a result of the lack of functional DNA repair mechanisms in mature sperm, the repair of DNA damage is largely dependent on this facility within the oocyte [14]. Should oxidative damage of sperm DNA overwhelm the oocyte's repair capacity, it may not only compromise the reproductive outcome of infertile couples by interfering with normal embryo or fetal development, but might also lead to perinatal morbidity and mortality as well as to the development of diseases such as childhood cancer and schizophrenia in the offspring [3,7]. Although it has been previously reported that oxidative damage of sperm DNA is a frequent finding in infertile males [5], it has never been reported whether this type

* Corresponding author. Fax: +33 473407042.

E-mail address: joel.drevet@univ-bpclermont.fr (J.R. Drevet).

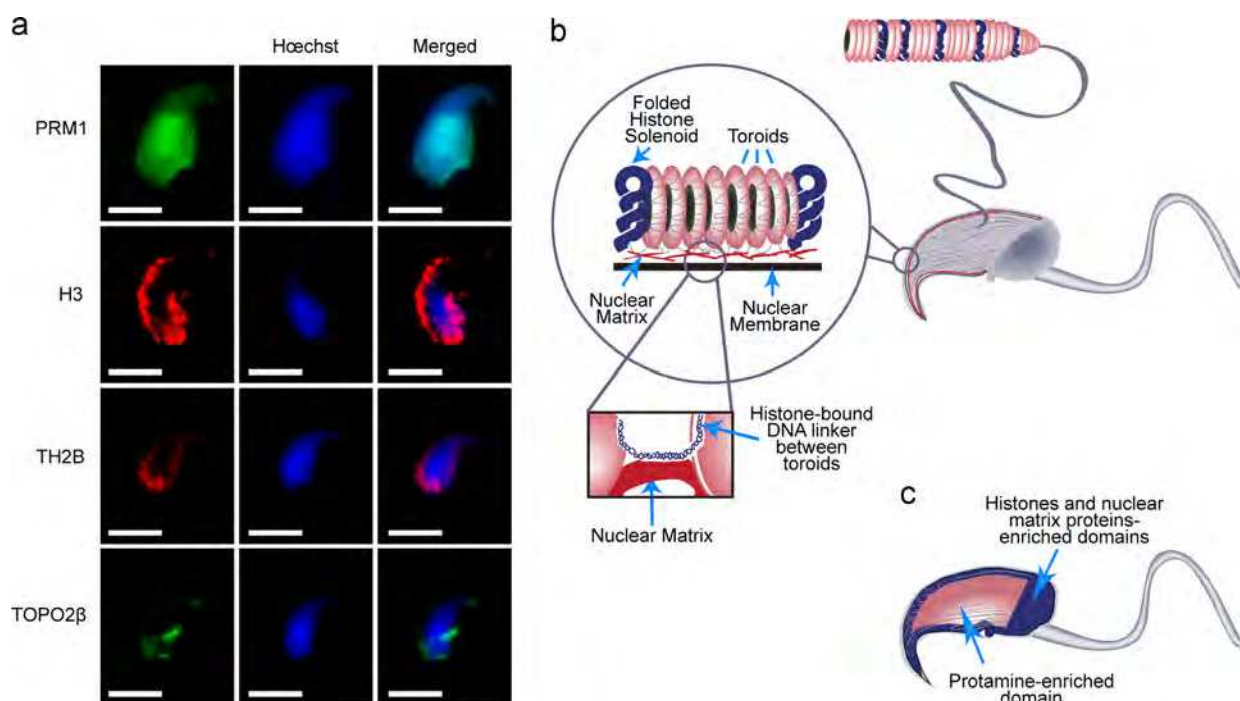


Fig. 1. Protamine- and histone-rich regions of the nucleus of cauda epididymal spermatozoa from wild-type (WT) mice. (a) Representative confocal microscopy images showing the immunofluorescent localization of protamine 1 (PRM1), histone H3, testis-specific histone 2B (TH2B), and the nuclear matrix component topoisomerase II β (TOPO2 β) in mature spermatozoa from the cauda epididymidis of WT mice (left). DNA was stained with Hoechst 33342. Note the preferential location of histones (H3 and TH2B) in the peripheral and basal regions of the sperm head, whereas PRM1 is primarily located in the central region of the sperm nucleus and TOPO2 β at the basal plate. (b) Detailed scheme of the widely accepted organization of the mammalian sperm nucleus as reported by Ward [10] and Johnson et al. [19]. Briefly, protamine-associated toroid stacks are interrupted at regular intervals by DNA sequences still associated with histones in the so-called solenoids. Histone-bound DNA is also found at DNA linker segments in between each toroid. At certain positions on each chromosome these particular domains are attached to protein complexes of the nuclear matrix. (c) Schematic representation of mouse sperm nuclear organization showing the preferential localization of histones at the peripheral and basal regions [15]. Bars, 5 μ m.

of damage is random or localized to specific areas of the sperm nucleus. Such knowledge would help in understanding better the relation between these paternal nuclear oxidative alterations and the reproductive outcome. It may also offer new leads for the development of clinical assays that could and should be used to monitor the integrity of the sperm nucleus that could lower the risk associated with ART procedures, especially with the intracytoplasmic sperm injection protocol (ICSI). With that goal in mind, we here address the question of where oxidative DNA alterations are located when spermatozoa are exposed to an oxidative environment either after collection or in situ during post-testicular maturation and storage. These two conditions reflect the classical situations of in vivo-damaged sperm nuclei and in vitro-damaged sperm nuclei (for example during ART procedures).

Materials and methods

Experiments were performed in compliance with the French and EU guidelines for the care and use of laboratory animals. Mice were culled by decapitation and spermatozoa were collected from the caudal segment of the epididymis. All immunofluorescence procedures were performed as previously described [15]. Primary antibodies were as follows: anti-8-OHdG (Novus Biologicals, clone 15A3), anti-TH2B (ab23913, Abcam), anti-H3 (ab1791, Abcam), anti-PRM1 (Briar Patch Biosciences, clone Hup1N), and anti-TOPO2 β (sc-13059, Santa Cruz). For double immunofluorescence, primary antibodies raised in different species were used and sequentially detected with secondary antibodies coupled to Alexa488 or Alexa555 (Invitrogen). Confocal images were obtained using a Zeiss LSM510Meta microscope and analyzed with ImageJ (U.S. National Institutes of Health). Fractionation, separation, and extraction of the soluble and insoluble chromatin fractions were performed as

previously described [16] using MNase digestion (5 U). The immunoblotting of 25 μ g of each DNA fraction was carried out on positively charged nylon membranes (Amersham Hybond-N+, GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. DNA oxidation was analyzed by immunodetection using the above-indicated anti-8-OHdG primary antibodies and anti-mouse IgG secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (from goat, PARIS Anticorps), according to the manufacturer's instructions for the use of the enhanced chemiluminescent substrate (SuperSignal West Femto Substrate Kit, Thermo Scientific).

Results and discussion

In a first set of experiments presented in Fig. 1, confocal immunofluorescence approaches with antibodies directed against persisting histones including the canonical H3 histone, the testis-specific histone H2B variant TH2B, and the sperm-specific protamine 1 (PRM1) proteins were used to estimate the organization of the mouse sperm nucleus collected from the cauda epididymidis of wild-type (WT) mice. Although PRM1 appears homogeneously distributed throughout the sperm head, it is primarily located in the central region of the sperm nucleus, where the highly compacted DNA is more reactive to Hoechst 33342 staining (Fig. 1a). In sharp contrast, H3- and TH2B-enriched DNA and thus, nucleosome-bound DNA, was localized in the peripheral and basal regions of the sperm head near the nuclear annulus [17]. This localization of histone- and protamine-rich domains found in mature mouse epididymal sperm is in good agreement with previous reports showing that sperm DNA linker regions between protamine-compacted toroid domains are bound to nucleosomes and attached to the nuclear matrix at the periphery of the nucleus [10,18,19] (Figs. 1b and c). These results are also concordant with

previous reports showing that nuclear annulus protein content is lower in protamines and higher in histones [11,20]. In addition, as shown in Fig. 1a, the distribution of TOPO2 β , a protein associated with the so-called S/MARs (sperm (nuclear) matrix attachment regions), was very similar to that of histone H3. These findings also support the notion that sperm DNA regions attached to the nuclear matrix, both at the nuclear periphery and at the nuclear annulus regions, are richer in nucleosomes compared to other regions of the sperm nucleus.

Having established the basal organization of the mouse sperm nucleus, the effect of oxidative stress on the nuclear organization of cauda epididymal sperm from WT mice was assessed by measuring the levels of oxidized guanine residues, 8-OHdG, before and after exposure to hydrogen peroxide (H_2O_2), a well-known physiological oxidative agent. Immunofluorescence analysis showed that 8-OHdG was undetectable in untreated sperm compared to H_2O_2 -treated sperm (Fig. 2a). Because in vitro-induced oxidative DNA damage might not mimic the oxidative damage that occurs under in vivo conditions, nuclear oxidative damage was assessed in cauda epididymal spermatozoa from *gpx5*^{-/-} mice, an animal model in which significant posttesticular oxidative damage of sperm DNA occurs, leading to loss of sperm fertilizing ability [15]. The distribution of 8-OHdG in the nucleus of cauda epididymal sperm from *gpx5*^{-/-} mice was similar to that found in H_2O_2 -treated spermatozoa from WT mice (Fig. 2a). Double immunolocalization analysis using either anti-H3+anti-8-OHdG antibodies or anti-TOPO2 β +anti-8-OHdG antibodies, shown in Figs. 2b and c respectively, further confirmed that 8-OHdG colocalized partially with nuclear regions rich in histone H3 and TOPO2 β nuclear matrix proteins. Although the surface area signal for 8-OHdG was larger than that observed for histone H3 and TOPO2 β , it was also preferentially located in the peripheral and basal nuclear regions. This finding was to be expected because the peripheral and basal nuclear regions correspond to DNA domains of lower compaction (i.e., nucleosome-bound) and, therefore, are more readily accessible to extracellular oxidants. These observations reinforce the notion that protamine association with sperm DNA contributes to a higher order of nuclear compaction through disulfide crosslinking, while in the meantime it protects sperm DNA against oxidation via its ability to quench the

H_2O_2 -oxidizing effect. Analysis of 8-OHdG in human spermatozoa could be of significant clinical utility in the diagnosis and treatment of infertility. This proposal is in agreement with a previous suggestion that sperm DNA fragmentation tests such as SCSA [21], comet [22], and TUNEL [23], which are often used with patients undergoing ART and considered gold standards in sperm DNA fragmentation testing [24], should be complemented by new tests that address the level of oxidation of the sperm DNA, such as the 8-OHdG assay presented here. This is also supported by the observation that DNA breaks within the toroids (i.e., not in the linker regions) were not shown to be as detrimental in terms of reproductive outcome as DNA breaks in the linker regions, thus suggesting that the integrity of the nontoroidal S/MAR linker regions should be the focus of these tests [13]. Because 8-OHdG oxidative damage targets specifically the S/MAR-associated and histone-bound linker regions between toroids it seems to be the most appropriate assay to consider.

Finally, to test further the robustness of our interpretation, cauda-retrieved epididymal spermatozoa from WT and *gpx5*^{-/-} mice were subjected to reduction using the reducing agent dithiothreitol (DTT) to provoke DNA decondensation, followed by histone detection using immunofluorescence analysis. Fig. 3a shows representative images of *gpx5*^{-/-} sperm phenotypes that ranged from mild loss of histones from the peripheral region of the nucleus to an intense detection outside the sperm head boundaries (insets in Fig. 3a illustrating an extreme situation). These events are associated with the formation of the so-called sperm nuclear halos comprising relaxed chromatin toroid loops rendering interspersed histone-associated solenoids more accessible to histone detection as previously reported [25–27] (Fig. 3b, left). These nuclear halos were significantly more frequent in sperm from *gpx5*^{-/-} mice compared with WT, thus confirming our initial observation that the nucleus of sperm from *gpx5*^{-/-} mice was more prone to decondensation than that of sperm from WT mice [15] (Fig. 3b, right). Interestingly, when nuclear halo formation was observed, 8-OHdG was never detected outside the nuclear boundaries. This is clearly illustrated in Fig. 3c, in which it can be seen that 8-OHdG was confined to the apical region of the sperm nucleus and was not found within the nuclear halos characterized

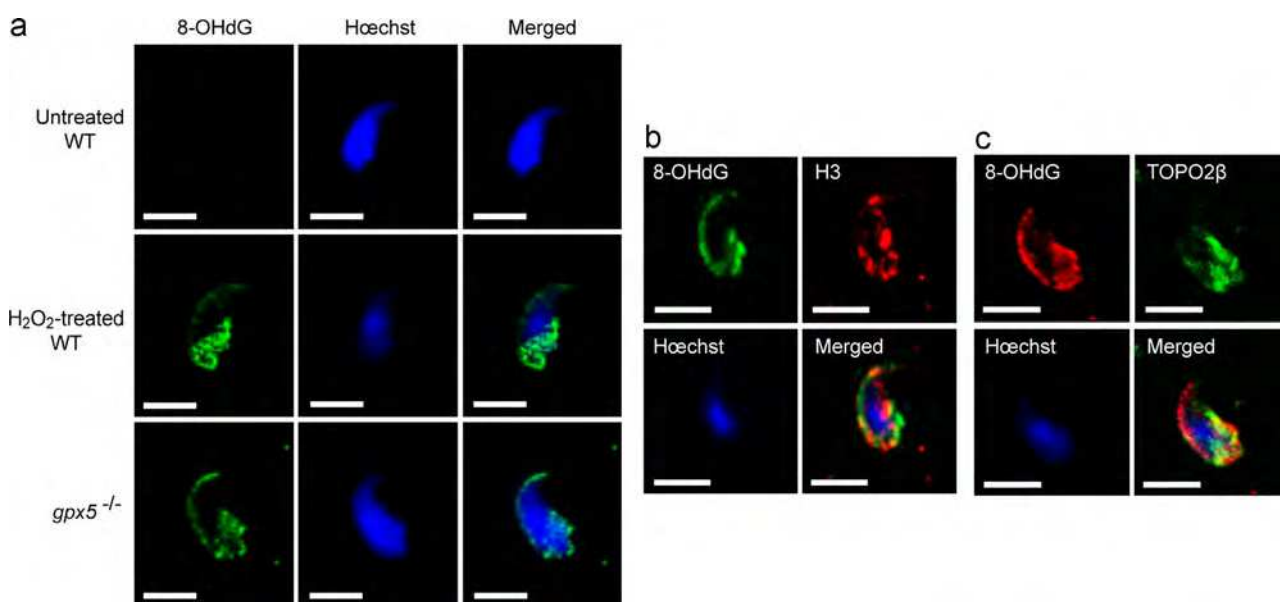


Fig. 2. 8-OHdG colocalizes with histone-rich and TOPO2 β -associated DNA domains. (a) Representative confocal microscopy images showing the immunofluorescent localization of 8-OHdG in untreated and H_2O_2 -treated spermatozoa from WT mice and in untreated cauda epididymal sperm from *gpx5*^{-/-} mice. DNA was stained with Hoechst 33342. (b, c) Double immunofluorescent staining showing the colocalization of 8-OHdG with histone H3 (b) or TOPO2 β (c) in cauda epididymal sperm from *gpx5*^{-/-} mice. Bars, 5 μ m.

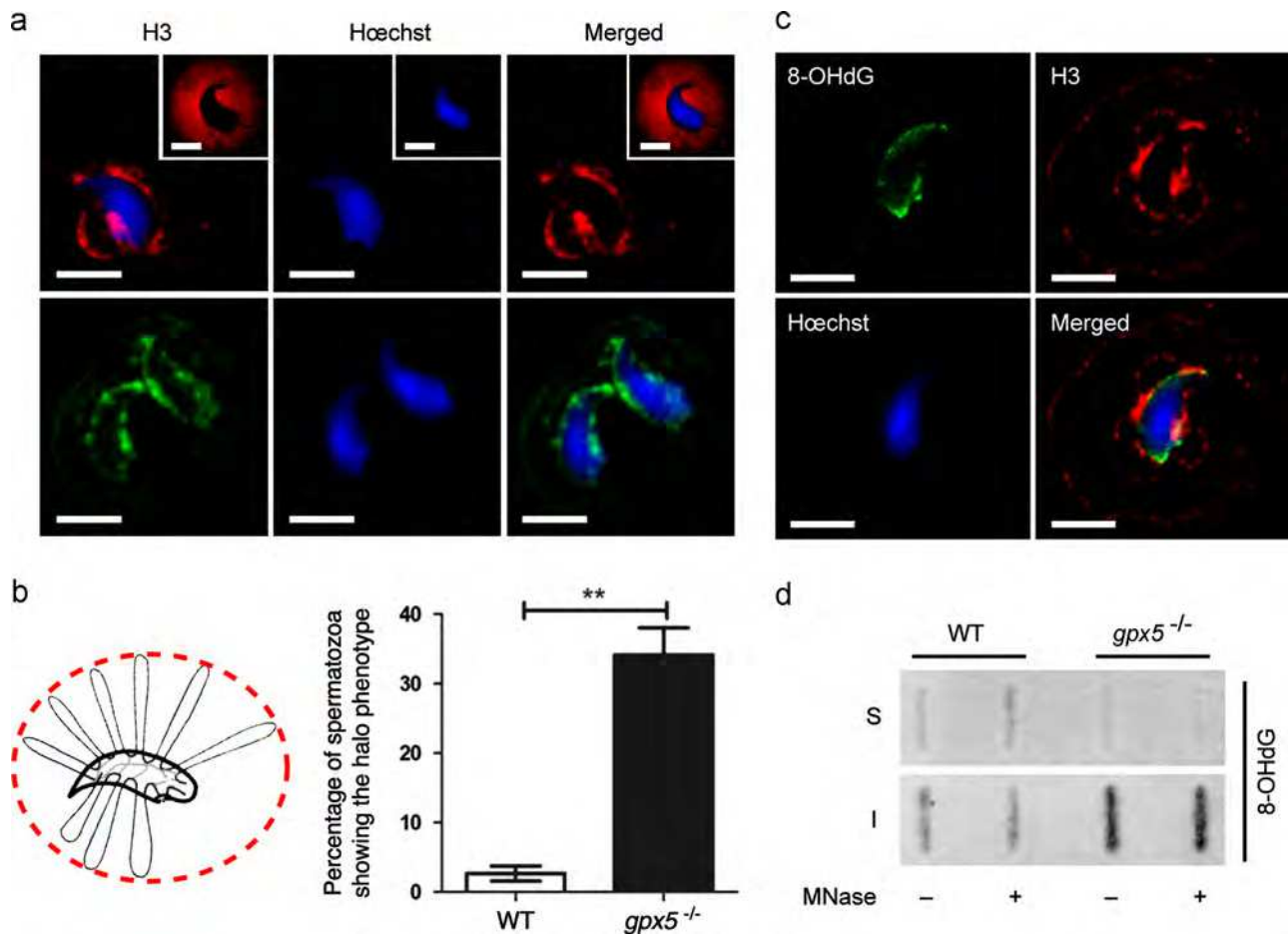


Fig. 3. 8-OHdG localization in cauda epididymal sperm from *gpx5*^{-/-} mice remains associated with histone-rich peripheral nuclear regions after mild chromatin decondensation. (a) Representative confocal microscopy images showing the immunofluorescent localization of core histone (in either red or green) in cauda spermatozoa from *gpx5*^{-/-} mice treated with DTT to induce decondensation of sperm chromatin and the appearance of typical halo phenotypes. The insets in the top row show an example of an extreme phenotype in which histone forms a regular halo around the sperm head. DNA in blue was stained with Hoechst 33342. Bars, 5 μ m. (b) Left: schematic representation of the typical halo phenotype obtained when relaxed toroids escape from the sperm head, exposing the DNA regions associated with histones [26,27]. Right: bar graph showing that the percentage of sperm presenting the halo phenotype was significantly higher in cauda sperm from *gpx5*^{-/-} mice compared to cauda epididymal sperm from WT mice after treatment with DTT. (c) Double immunofluorescent staining showing the colocalization of 8-OHdG with histone H3. Bars, 5 μ m. (d) Slot blot showing 8-OHdG immunochemical detection of DNA extracts from decondensed sperm from WT or *gpx5*^{-/-} cauda epididymal spermatozoa with or without micrococcal nuclease digestion [28] (MNase), which respectively refers to the soluble (S) or insoluble (I) chromatin fraction.

by high histone reactivity. This observation supports our interpretation that oxidative damage preferentially targets those DNA domains likely to be in a nucleosomal-like arrangement and attached to the nuclear matrix, which because of their association with the peripheral nuclear matrix are restricted to within the sperm head. To further confirm these findings, nuclear halo formation was induced in sperm from both WT and *gpx5*^{-/-} mice and subjected to enzymatic micrococcal nuclease digestion (MNase), as previously described [16]. The sperm pellet fraction corresponding to the insoluble chromatin was then isolated away from the soluble “shaved” DNA fraction, and the DNA was extracted from both the soluble and the pellet fractions and subsequently assayed for 8-OHdG reactivity. As shown in Fig. 3d, insoluble chromatin fractions of sperm from *gpx5*^{-/-} mice are more reactive toward the 8-OHdG antibody than WT spermatozoa, concordant with the fact that cauda epididymal sperm from *gpx5*^{-/-} mice showed higher levels of oxidative DNA damage [15]. In addition, 8-OHdG detection was highest in the insoluble chromatin fraction compared to the soluble fraction, thus confirming that most of the oxidized DNA remained bound to the sperm cell and was not in digested halos, regardless of whether MNase was performed or not. This behavior is in agreement with the notion that histone-rich

and nuclear matrix-attached sperm DNA regions are the ones preferentially targeted by oxidative damage.

In conclusion, the main finding emerging from this study is that posttesticular oxidative DNA damage targets specific chromatin domains of lower compaction associated with histones and attached to the sperm nuclear matrix. Recent findings have shown that these specific domains of the paternal genome are enriched in genes involved in the control of postfertilization DNA replication events and in the onset of the embryonic developmental program [12]. Our findings show that these specific domains represent the Achilles’ heel of the mammalian sperm nucleus. Because human spermatozoa have the highest percentage of persisting histones (up to 15% compared to the 1–2% level of mouse sperm), they will be at a higher risk for posttesticular oxidative DNA damage compared to sperm from other mammalian species. This should also be of great concern during sperm processing and sperm cryopreservation in which significant iatrogenic oxidative DNA-induced damage may take place. This may explain, at least in part, the high rate of failure in ICSI when using sperm with significant DNA damage [28]. These findings also highlight the importance of developing additional tests for the measurement of sperm DNA oxidative damage that can be readily used in a clinical setting.

Current tests used for sperm DNA damage testing, including TUNEL, SCSA, and comet, have low predictive power in terms of reproductive outcome [29], essentially because they solely address the issue of sperm DNA fragmentation and sperm nucleus compaction. As previously mentioned, these tests, for the most part, measure DNA breaks within the nuclear toroids, which are known to be of lower concern in terms of reproductive outcome as opposed to DNA damage in the nontoroidal S/MAR linker regions, where oxidative DNA damage mainly takes place [12]. Our findings should help significantly in understanding the impact of oxidative DNA damage on embryo and fetal development and, at the same time, provide new tools and strategies to improve the diagnosis and treatment of infertile couples, including the outcome of ART.

Author contributions

A.N., B.K., C.D.-S., J.H.-B., and A.K. performed most experiments. A.K., R.C., F.S., L.J., H.P.-R., and J.R.D. conceived the study. A.K., J.G.A., and J.R.D. wrote the manuscript.

Acknowledgments

A.N. was supported by the French Ministry of Higher Education and Research (MESR), A.K., R.C., F.S., R.G., J.H.-B., L.J., H.P.-R., C.D.-S., and J.R.D. received funds from INSERM, CNRS, and MESR. J.R.D. is indebted to the French Andrology Society for its continuous support. We thank C. Vachias and J.-L. Couderc for technical assistance.

References

- [1] Aitken, R. J.; De Iuliis, G. N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* **16**:3–13; 2010.
- [2] Paul, C.; Nagano, M.; Robaire, B. Aging results in differential regulation of DNA repair pathways in pachytene spermatocytes in the Brown Norway rat. *Biol. Reprod.* **85**:1269–1278; 2011.
- [3] Barratt, C. L.; Aitken, R. J.; Björndahl, L.; Carrell, D. T.; de Boer, P.; Kvist, U.; Lewis, S.E.; Perreault, S.D.; Perry, M.J.; Ramos, L.; Robaire, B.; Ward, S.; Zini, A.; Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications—a position report. *Hum. Reprod.* **25**:824–838; 2010.
- [4] Zini, A.; Libman, J.; Sperm, DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *Can. Med. Assoc. J.* **175**:495–500; 2006.
- [5] Cohen-Bacrie, P.; Belloc, S.; Menezo, Y. J.; Clement, P.; Hamidi, J.; Benkhalifa, M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil. Steril.* **91**:1801–1805; 2009.
- [6] Watson, P. F. The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* **60–61**:481–492; 2000.
- [7] Aitken, R. J.; de Iuliis, G. N. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod. Biomed. Online* **14**:727–733; 2007.
- [8] Miller, D.; Brinworth, M.; Iles, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* **139**:287–301; 2010.
- [9] Drevet, J. R. Protection of epididymal spermatozoa from oxidative damage. In: Agarwal, A.; Aitken, R. J.; Alvarez, J. G., editors. *Studies on Men's Health and Fertility: Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 95–118.
- [10] Ward, W. S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol. Hum. Reprod.* **16**:30–36; 2010.
- [11] Li, Y.; Lalancette, C.; Miller, D.; Krawetz, S. A. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J. Androl.* **10**:535–541; 2008.
- [12] Hammoud, S. S.; Nix, D. A.; Zhang, H.; Purwar, J.; Carrell, D. T.; Cairns, B. R. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* **460**:473–478; 2009.
- [13] Shaman, J. A.; Yamauchi, Y.; Ward, W. S. Function of the sperm nuclear matrix. *Arch. Androl. J. Reprod. Syst* **53**:135–140; 2007.
- [14] Meseguer, M.; Santiso, R.; Garrido, N.; García-Herrero, S.; Remohí, J.; Fernandez, J. L. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil. Steril.* **95**:124–128; 2011.
- [15] Chabory, E.; Damon, C.; Lenoir, A.; Kauselmann, G.; Kern, H.; Zevnik, B.; Garrel, C.; Saez, F.; Cadet, R.; Henry-Berger, J.; Schoor, M.; Gottwald, U.; Habenicht, U.; Drevet, J. R.; Vernet, P. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J. Clin. Invest.* **119**:2074–2075; 2009.
- [16] Arpanahi, A.; Brinkworth, M.; Iles, D.; Krawetz, S. A.; Pardowska, A.; Platts, A. E.; Saïda, M.; Steger, K.; Tedder, P.; Miller, D. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res.* **9**:1338–1349; 2009.
- [17] Ward, W. S.; Coffey, D. S. Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor. *Biol. Reprod.* **41**:361–370; 1989.
- [18] Gatewood, J. M.; Cook, G. R.; Balhorn, R.; Schmid, C. W.; Bradbury, E. M. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J. Biol. Chem.* **265**:20662–20666; 1990.
- [19] Johnson, G. D.; Lalancette, C.; Linnemann, A. K.; Leduc, F.; Boissonneault, G.; Krawetz, S. A. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction* **141**:21–36; 2011.
- [20] Zalensky, A. O.; Siino, J. S.; Gineitis, A. A.; Zalenskaya, I. A.; Tomilin, N. V.; Yau, P.; Bradbury, E. M. Human testis/sperm-specific histone H2B (thTSH2B): molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* **277**:43474–43480; 2002.
- [21] Evenson, D. P.; Larson, K. L.; Jost, L. K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* **1**:25–43; 2002.
- [22] Lewis, S. E.; Agbaje, I. M. Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. *Mutagenesis* **22**:163–170; 2008.
- [23] Spano, M.; Seli, E.; Bizzaro, D.; Manicardi, G. C.; Sakkas, D. The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **17**:255–260; 2005.
- [24] Lewis, S. E.; Agbaje, I.; Alvarez, J. G.; Sperm, DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **54**:111–125; 2008.
- [25] Volgestein, B.; Pardoll, D. M.; Coffey, D. S. Supercoiled loops and eukaryotic DNA replication. *Cell* **22**:79–85; 1980.
- [26] Nadel, B.; De Lara, J.; Finkernagel, S. W.; Ward, W. S. Cell specific organization of the 5 S ribosomal RNA gene cluster DNA loop domains in spermatozoa and somatic cells. *Biol. Reprod.* **53**:1222–1228; 1995.
- [27] Mohar, L.; Szczygiek, M. A.; Yanagimachi, R.; Ward, W. S. Sperm nuclear halos can transform into normal chromosomes after injection into oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **62**:416–420; 2002.
- [28] Tarozzi, N.; Bizzaro, D.; Flamigni, C.; Borini, A. Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online* **14**:746–757; 2007.
- [29] Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertil. Steril.* **90**:178–180; 2008.